

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Química

Amanda Oliveira Mourão

**DEGRADAÇÃO DOS ÁCIDOS HALOACÉTICOS PELO MÉTODO FENTON-LIKE
CATALISADO POR MAGNETITA DOPADA COM COBALTO E ANÁLISE POR
CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Teófilo Otoni - MG

2018

Amanda Oliveira Mourão

**DEGRADAÇÃO DOS ÁCIDOS HALOACÉTICOS PELO MÉTODO FENTON-LIKE
CATALISADO POR MAGNETITA DOPADA COM COBALTO E ANÁLISE POR
CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Jairo Lisboa Rodrigues

Teófilo Otoni – MG

2018

Ficha Catalográfica
Preparada pelo Serviço de Biblioteca/UFVJM
Bibliotecário responsável: Gilson Rodrigues Horta – CRB6 nº 3104

M931d Mourão, Amanda Oliveira.
2019 Degradação dos ácidos haloacéticos pelo método Fenton-Like catalisado por magnetita dopada com cobalto e análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. / Amanda Oliveira Mourão. Teófilo Otoni, 2019.
69 p. ; il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Programa de Pós-Graduação em Química, 2019.

Orientador: Prof. Dr. Jairo Lisboa Rodrigues.

1. Ácidos haloacéticos. 2. Fenton-Like. 3. Magnetita dopada com cobalto. 4. Extração líquido-líquido. 5. Tratamento da água. I. Título.

CDD: 547

DEGRADAÇÃO DOS ÁCIDOS HALOACÉTICOS PELO MÉTODO FENTON-LIKE CATALISADO POR MAGNETITA DOPADA COM COBALTO E ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

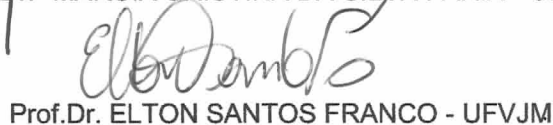
Dissertação apresentada ao
MESTRADO EM QUÍMICA, nível de
MESTRADO como parte dos requisitos
para obtenção do título de MESTRA
EM QUÍMICA

Orientador (a): Prof. Dr. Jairo Lisboa
Rodrigues

Data da aprovação : 20/12/2018


Prof.Dr. JAIRÓ LISBOA RODRIGUES - UFVJM


Prof.Dr.^a MÁRCIA CRISTINA DA SILVA FÁRIA - UFVJM


Prof.Dr. ELTON SANTOS FRANCO - UFVJM

Ao meu esposo, pais, irmãos, amigos e docentes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me proporcionado essa oportunidade, com saúde, paciência e sabedoria e por ser minha força nos momentos mais difíceis. Pela concretização de um sonho que em alguns momentos parecia ser impossível.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jairo Lisboa Rodrigues, por ter me direcionado durante todo o curso, compartilhando seus ensinamentos e pela sua paciência e confiança em mim depositada.

A minha família pelo amor, incentivo e compreensão. Aos meus pais que mesmo estando distantes, nunca estiveram ausentes. Dedico esta conquista especialmente a eles.

A todos os meus colegas da Pós-Graduação e aos alunos de Iniciação Científica, que estiveram presentes e se tornaram grandes amigos, por serem tão prestativos e companheiros. Em especial ao Diego, Mari, Elton e Thamyris, que tanto contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigada.

A CAPES, FAPEMIG, CNPq e FUNASA pelo o apoio financeiro e pela bolsa de estudo concedida, que me auxiliou na realização da pesquisa.

À UFVJM por me fornecer os recursos necessários e estrutura laboratorial para o desenvolvimento desta pesquisa e a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química da UFVJM pelos ensinamentos.

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os contaminantes emergentes geram riscos à qualidade da água, sendo potencialmente tóxicos ao meio ambiente e a saúde humana. Os ácidos haloacéticos (AHAs), pertencentes à classe desses contaminantes, são subprodutos da oxidação química formados pelo processo de cloração da água nas Estações de Tratamento de Água (ETA), com alto potencial de risco carcinogênico em seres humanos. Devido aos riscos gerados por esses contaminantes, desenvolveu-se um método para avaliar a capacidade de degradação dos AHAs em água, pelo processo Fenton-like catalisado por nanopartículas de magnetita dopada com cobalto ($\text{Fe}_3\text{-}_x\text{Co}_x\text{O}_4$), com extração desses contaminantes por Extração líquido-líquido (LLE) e a análise via Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS). O método desenvolvido mostrou-se eficiente na degradação parcial dos AHAs, com melhores valores de degradação de 62,5%, 61,57%, 30,01%, 38,96%, 36,83%, 50,23%, 83,5%, 40,72% e 78,97% para os compostos ácido monocloroacético (MCAA), ácido monobromoacético (MBAA), ácido dicloroacético (DCAA), ácido tricloroacético (TCAA), ácido bromocloroacético (BCAA), ácido dibromoacético (DBAA), ácido bromodicloroacético (BDCAA), ácido dibromocloroacético (DBCAA) e ácido tribromoacético (TBAA), respectivamente. Através da aplicação do teste de *Allium cepa*, foram avaliados a citotoxicidade, genotoxicidade e a mutagenicidade dos AHAs. Os resultados comprovam seus efeitos citotóxicos e mutagênicos às células meristemáticas de *Allium cepa*. Por meio deste estudo, foi possível verificar a eficácia do método desenvolvido e o seu potencial como proposta de remediação ambiental.

Palavras-chave: Ácidos haloacéticos, Fenton-Like, magnetita dopada com cobalto, extração líquido-líquido, tratamento da água, bioensaio.

ABSTRACT

Emerging contaminants pose risks to water quality, being potentially toxic to the environment and human health. Haloacetic acids (HAAs), belonging to the class of these contaminants, are by-products of chemical oxidation formed by the process of water chlorination in Water Treatment Station (ETAs), with a high potential for carcinogenic risk in humans. Due to the risks generated by these contaminants, a method was developed to evaluate the degradation capacity of HAAs in water by the Fenton-like process catalyzed by magnetite doped with cobalt nanoparticles ($\text{Fe}_{3-x}\text{Co}_x\text{O}_4$), with extraction of these contaminants by liquid-liquid extraction (LLE) and the analysis by Gas Chromatography / Mass Spectrometry (GC-MS). The method developed was efficient in the partial degradation of HAAs, with better degradation values of 62.5%, 61.57%, 30.01%, 38.96%, 36.83%, 50.23%, 83.5%, 40.72% and 78.97% for the compounds monochloroacetic acid (MCAA), monobromoacetic acid (MBAA), dichloroacetic acid (DCAA), trichloroacetic acid (TCAA), bromochloroacetic acid (BCAA), dibromoacetic acid (DBAA), bromodichloroacetic acid (BDCAA), dibromochloroacetic acid (DBCBA) and tribromoacetic acid (TBAA), respectively. Through the application of the *Allium cepa* test, the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of HAAs were evaluated. The results confirm its cytotoxic and mutagenic effects on *Allium cepa* meristematic cells. Through this study, it was possible to verify the effectiveness of the developed method and its potential as a proposal for environmental remediation.

Keywords: Haloacetic acids, Fenton-Like, magnetite doped with cobalt, liquid-liquid extraction, water treatment, bioassay.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figure 1 - Flowchart of LLE Analytical Procedure of the HAAs.....	42
Figure 2 - Photomicrography of the nanoparticle $\text{Fe}_{3-x}\text{Co}_x\text{O}_4$ obtained by TEM	43
Figure 3 - Pareto charts for the standardized effects for $p=0.05$ of optimization of parameters for degradation of HAAs.....	46
Figure 4 - Interaction effect graphs for optimization of parameters for degradation of DCAA, TCAA and BCAA.	49
Figure 5 – Interaction effect graphs for optimization of parameters for degradation of DBAA.	51
Figure 6 – Photomicrography of optical microscope of the phases of cell division. A. prophase; B. metaphase; C. anaphase and D. telophase, final magnification of 1000x.	55
Figure 7 - Cell division of the analyzed samples and standard deviation around the mean for 24 hours of exposure.	56
Figure 8 – Photomicrography of optical microscope of the chromosomal aberrations. A ₁ . anaphase bridge; B ₁ . anaphase with chromosome break; C ₁ . telophase bridge and micronucleus, final magnification of 1000x.	57
Figure 9 – Chromosomal aberrations analyzed and standard deviation around the mean for 24 hours of exposure.	58
Figure 10 – Photomicrography of optical microscope of the micronuclei present in the mitotic phases. A ₂ interphase with micronucleus; B ₂ prophase with micronucleus; C ₂ metaphase with micronucleus; D ₂ telophase with bridge and micronucleus, final magnification of 1000x.	59
Figure 11 – Occurrence of micronuclei in the analyzed samples and standard deviation around the mean for 24 hours of exposure.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nomenclatura, Abreviatura e Fórmula química dos AHAs	17
Tabela 2 - Tipos de Processos Oxidativos Avançados.....	25
Table 1 - Factors and levels determined in complete planning 2^3 with center point.....	44
Table 2 – Complete factorial planning 2^3 with center point.....	44
Table 3 - Degradation rate for HAAs in percentage (%).	45
Table 4 - Effects and errors for the factors studied in complete factorial planning 2^3 for degradation of compounds DCAA, TCAA and BCAA	48
Table 5 – Effects and errors for the factors studied in complete factorial planning 2^3 for degradation of compound DBAA.....	50
Table 6 – Number of cells in cell division and MI.	55
Table 7 – Result of the chromosomal aberrations found in the analyzes.	57
Table 8 - Data of the micronuclei found in the analyzed samples.	59
Table 9 – Statistical comparison between samples with C^- for analysis of mutagenicity.....	61

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

AHAs – Ácido haloacético
BCAA – Ácido bromocloroacético
BDCAA – Ácido dicloroacético
C⁻ – Controle Negativo
CA – chromosome aberrations
CG – Cromatógrafo Gasoso
GC/ECD – Cromatografia Gasosa por Detector de Captura de Elétrons
GC/MS – Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
DBAA – Ácido dibromoacético
DBCAA – Ácido dibromocloroacético
DCAA – Ácido dicloroacético
ETA – Estação de Tratamento de Água
HAAs – Haloacetic acids
IARC – International Agency for Research on Cancer
IPCS – International Programme on Chemical Safety
LLE – Extração Líquido-Líquido
MBAA – Ácido monobromoacético
MCAA – Ácido monocloroacético
MI – mitotic index
MTBE – Metil tert-butil éter
NTP – National Toxicology Program
•OH – Radical Hidroxila
PD – Pós Degradação
PHAC – Public Health Agency of Canada
POAs – Processos Oxidativos Avançados
TAME – tert-amyl methyl ether
TBAA – Ácido tribromoacético
TCAA – Ácido tricloroacético
TEM – Transmission Electron Microscopy
UNEP – United Nations Environment Programme
USEPA – United States Environmental Protection Agency

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1 Ácidos Haloacéticos.....	17
3.1.1 Aspéctos Toxicológicos.....	18
3.1.2 Legislação	19
3.1.3 Métodos de Extração	20
3.1.4 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas	22
3.1.5 Métodos para Quantificação Estabelecidos pela USEPA.....	22
3.1.5.1 Método USEPA 552.1	23
3.1.5.2 Métodos USEPA 552.2.....	23
3.1.5.3 Método USEPA 552.3	24
3.1.5.4 Standard Methods 6251B	24
3.2 Processos Oxidativos Avançados	24
3.2.1 Processo Fenton	25
3.2.1.1 Nanopartículas Catalisadoras	26
3.3 Teste <i>Allium cepa</i>	27
REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO 2.....	36
1. INTRODUCTION	37
2. MATERIALS AND METHODS	39
2.1 Materials.....	39

2.2	Synthesis of $\text{Fe}_{3-x}\text{Co}_x\text{O}_4$ Nanoparticles	39
2.3	Characterization of Magnetite Co-doped Nanoparticles	39
2.4	<i>Allium cepa</i> Test	40
2.5	Degradation of HAAs by the Fenton process catalyzed by $\text{Fe}_{3-x}\text{Co}_x\text{O}_4$	40
2.6	Extraction of Haloacetic Acids	41
2.7	Instruments and Chromatographic Conditions.....	41
3.	RESULTS AND DISCUSSIONS	43
3.1	Characterization of Nanoparticles $\text{Fe}_{3-x}\text{Co}_x\text{O}_4$	43
3.2	Degradation of Haloacetic Acids	43
3.2.1	<i>Studies of the Effects of Degradation Variable for DCAA, TCAA and BCAA</i>	43
3.2.2	<i>Studies of the Effects of Degradation Variable for DBAA</i>	50
3.3	Evaluation of Cytotoxicity, Genotoxicity and Mutagenicity by <i>Allium cepa</i> bioassay	54
3.3.1	<i>Cytotoxicity Analysis</i>	54
3.3.2	<i>Genotoxicity Analysis.....</i>	56
3.3.3	<i>Mutagenicity Analysis.....</i>	58
4.	CONCLUSIONS	63
	ACKNOWLEDGMENTS.....	63
	REFERENCES	64
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69

CAPÍTULO 1

1. Introdução

A água é um recurso natural indispensável para a sobrevivência de todas as espécies, de extenso valor ambiental, social e econômico, fundamental para diversas atividades, como a agricultura, indústria e o consumo humano. Porém, essas atividades e a criação de novos produtos químicos nelas inclusos, colocam em risco a qualidade da água, ocasionando a contaminação ambiental (GEISSEN *et al.*, 2015).

Nas últimas décadas, estudos sobre os contaminantes ou poluentes emergentes têm se tornado um tema de grande relevância na área ambiental, por serem potencialmente tóxicos ao meio ambiente e a saúde humana, produzindo efeitos adversos aos organismos expostos, mesmo em baixas concentrações (da ordem $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1}), derivados principalmente da descarga de efluentes de águas residuais urbanas (GEISSEN *et al.*, 2015; PETRIE; BARDEN; KASPRZYK-HORDERN, 2014).

Essas substâncias são utilizadas diariamente em grande quantidade, originadas predominantemente de fármacos, produtos de uso pessoal, surfactantes, produtos químicos industriais, subprodutos de oxidação química, dentre outras classes. Sua inserção é contínua no ambiente, não sendo necessário serem persistentes neste para gerarem riscos à saúde ambiental e humana (PETROVIĆ; GONZALEZ; BARCELÓ, 2003).

Os ácidos haloacéticos (AHAs) são compostos orgânicos halogêneos clorados e/ou bromados, pertencentes à classe dos subprodutos de oxidação química, constituindo um dos subprodutos mais abundantes formados no processo de pré-cloração para purificação da água nas Estações de Tratamento de Água (ETAs), a partir da reação do cloro com a matéria orgânica presentes no meio (CHIAVELLI, 2014; HONG; SONG; KARANFIL, 2013; XIE, 2001).

Essa classe de subprodutos orgânicos halogenados é constituída por nove compostos, sendo eles: ácido monocloraacético (MCAA), ácido dicloraacético (DCAA), ácido tricloroacético (TCAA), ácido monobromoacético (MBAA), ácido dibromoacético (DBAA), ácido tribromoacético (TBAA), ácido bromocloraacético (BCAA), ácido bromodicloroacético (BDCAA), ácido dibromocloraacético (DBCAA). Devido aos potenciais

riscos à saúde, a Portaria de Consolidação nº 05 de 28/09/2017, que estabelece os padrões brasileiros de potabilidade, definiu o valor máximo permitido para a soma de sete AHAs (MCAA, DCAA, TCAA, MBAA, DBAA, BCAA, BDCAA) e DALAPON em água tratada de $80 \mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2017). A *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) regulamenta valores de contaminação máxima de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ para a soma de cinco AHAs (MCAA, DCAA, TCAA, MBAA e DBAA) em água tratada. Por conseguinte, a *World Health Organization* (WHO) definiu esses valores em $20 \mu\text{g L}^{-1}$, $50 \mu\text{g L}^{-1}$ e $200 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente para o MCAA, DCAA e TCAA (LIU; MOU, 2004a; WHO, 2011).

Estudos epidemiológicos apontam para o alto potencial de risco cancerígeno e mutagênico dos AHAs em seres humanos (LIMA, 2014). Estudos citogenéticos têm demonstrado que pessoas com alterações citogênicas elevadas possuem maiores riscos de desenvolverem cânceres. Portanto, testes com organismos vivos ou bioensaios são importantes para prever os possíveis riscos à saúde humana e ambiental. O Teste de *Allium cepa* é considerado um eficiente bioindicador de substâncias com potencial genotóxico e mutagênico, pois avalia as possíveis alterações e aberrações cromossômicas geradas por contaminantes em células meristemáticas, através de estudos da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade. É um teste favorável devido ao crescimento rápido da raiz, reduzido número de cromossomos com tamanho considerável, o que facilita sua visualização e análise (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Visto o impacto potencialmente negativo dos contaminantes orgânicos, é essencial o desenvolvimento de métodos que possam ser utilizados na degradação desses poluentes no tratamento de água das ETAs. Uma alternativa para a degradação desses contaminantes é pelos Processos Oxidativos Avançados (POAs), em que há a formação de radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) altamente reativos, que oxidam a matéria orgânica. Entre os vários tipos de POAs, o processo de Fenton se destaca por ser um método simples, rápido, sustentável e de baixo custo. Dentre os óxidos de ferro utilizados no processo como catalizadores, a magnetita dopada com cobalto ($\text{Fe}_{3-x}\text{Co}_x\text{O}_4$) possui maior grau de atividade de Fenton (ESTEVES *et al.*, 2015; SCHULTE *et al.*, 1995).

De acordo com Esteves *et al.* (2015), o processo de Fenton com uso da magnetita Co-dopada ($\text{Fe}_{3-x}\text{Co}_x\text{O}_4$), baseia-se na oxidação da matéria orgânica pelo sistema $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{Fe}_{3-x}\text{Co}_x\text{O}_4$, onde as nanopartículas catalisadoras de $\text{Fe}_{3-x}\text{Co}_x\text{O}_4$ na presença de H_2O_2 geram um sistema altamente oxidante, devido à formação de radicais hidroxila, no qual os compostos orgânicos em geral presente no meio aquoso são oxidados. Devido às suas propriedades

magnéticas, o $\text{Fe}_{3-x}\text{Co}_x\text{O}_4$ pode ser facilmente recuperado e reutilizado em processos subsequentes de degradação da matéria orgânica.

Baseado nesses aspectos, foi desenvolvido um método eficaz e de baixo custo para a degradação dos AHAs, pelo processo de Fenton com magnetita Co-dopada. A extração desses compostos da matriz aquosa por Extração líquido-líquido (LLE) e monitoramento do processo via GC-MS. Para a avaliação de um possível efeito biológico, realizou-se o Teste de *Allium cepa* como organismo-teste indicador genotóxico e mutagênico dos AHAs, através dos estudos da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade desses contaminantes.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de degradação dos ácidos haloacéticos presentes em amostras de água, pelo processo de Fenton-like catalisado pela nanopartícula magnetita dopada com cobalto, como proposta de melhoria da qualidade da água em relação a esses contaminantes emergentes.

2.2 Objetivos Específicos

- Testar a reação de Fenton-like catalisada pela nanopartícula magnetita dopada com cobalto no processo de degradação dos AHAs e analisar qualitativa e quantitativamente por GC-MS;
- Avaliar a toxicidade dos compostos estudados através do Teste de *Allium cepa* em amostras de água contaminadas pelos compostos orgânicos estudados, antes e após a sua degradação, a fim de avaliar se houve a diminuição da toxidade gerada pelos AHAs.

3. Revisão da Literatura

3.1 Ácidos Haloacéticos

O processo de desinfecção da água de abastecimento público resulta na formação dos AHAs, segunda classe de subprodutos de desinfecção mais predominantes no processo, após os trihalometanos e com um alto impacto ambiental e toxicológico. Eles são formados a partir do ácido acético, havendo a substituição de um ou mais átomos de hidrogênio por halogênio, cloro, bromo ou iodo, dando origem as diferentes espécies de AHAs. Os ácidos haloacéticos iodados são pouco estudados, devido a sua dificuldade de detecção (CARDADOR; SALGUERO; GALLEG0, 2015; LOOS; BARCELÓ 2001, XIE, 2004).

Os nove compostos de ácidos haloacéticos clorados e/ou bromados são distribuídos em grupos distintos, sendo eles os mono-haloacéticos, di-haloacéticos e tri-haloacéticos, com um, dois e três halogênios, respectivamente (LIU; MOU, 2004b). A Tabela 1 representa todos esses compostos e suas fórmulas químicas.

Tabela 1 – Nomenclatura, Abreviatura e Fórmula química dos AHAs		
Ácidos Haloacéticos	Abreviação	Fórmula química
Monocloroacético	MCAA	CH ₂ ClCOOH
Monobromoacético	MBAA	CH ₂ BrCOOH
Dicloroacético	DCAA	CHCl ₂ COOH
Dibromoacético	DBAA	CHBr ₂ COOH
Bromocloroacético	BCAA	CHBrClCOOH
Tricloroacético	TCAA	CCl ₃ COOH
Tribromoacético	TBAA	CBr ₃ COOH
Bromodicloroacético	BDCAA	CBrCl ₂ COOH
Dibromocloroacético	DBCAA	CBr ₂ ClCOOH

Fonte: Adaptado de Xie (2004).

3.1.1 Aspectos Toxicológicos

As primeiras pesquisas relacionadas com o estudo do desenvolvimento dos subprodutos orgânicos halogenados em água potável, ocorreram em 1970, por Rook (1974) e Bellar *et al.* (1974), que também investigaram os riscos à saúde relacionados aos mesmos.

A ocorrência de tumores hepáticos foi relatada em ratos fêmea expostos a doses relativamente altas de DCAA e TCAA, durante 4 a 7 semanas. As características das lesões foram diferentes entre os dois contaminantes. O desenvolvimento de tumores hepáticos em ratos expostos ao TCAA foi proporcional ao aumento da dose, entretanto, a indução de tumores pelo DCAA foi exponencial a dosagem aplicada, o que indica um maior risco de câncer em humanos pelo DCAA (PEREIRA; PHELPS, 1996).

Em estudos realizados pelo *National Toxicology Program* (NTP), desenvolvido pela USEPA, foi analisado a toxicidade e carcinogenicidade do DBAA em ratos machos e fêmeas, expostos a diferentes concentrações do composto por até dois anos, observando-se lesões testiculares, aumento da incidência de degeneração cística do fígado e hematopoese esplênica nos machos, aumento da incidência de hiperplasia epitelial alveolar nas fêmeas, e, em ambos, o aumento da incidência de leucemia mononuclear, neoplasias hepatocelulares e pulmonares e hepatoblastoma, afirmando seus efeitos cancerígenos (NTP, 2007).

Lesões testiculares e anormalidades morfológicas dos espermatozoides foram observadas em ratos machos adultos expostos ao DCAA e DBAA. No entanto, o DCAA apresentou toxicidade menor em concentrações molares iguais para ambos os contaminantes (LINDER *et al.*, 1997).

Os efeitos da administração de diferentes doses de TCAA foram avaliados na gestação de ratos. Foi observada a diminuição de peso das ratas prenhas, principalmente do baço e rins, enquanto os fetos apresentaram malformações congênitas, quando expostos a concentrações superiores a 330 mg Kg⁻¹ (SMITH *et al.*, 1989).

De acordo com PHAC (2008), testes realizados em cobaias expostas a diferentes espécies de AHAs, apresentaram evidências sobre o risco de câncer e interferência na reprodução. A *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 2007) classificou o DCAA como provável cancerígeno à humanos em 2002, a partir de estudos em animais, os quais demonstraram a presença de tumores hepáticos, deposição de glicogênio e danos ao DNA. O composto TCAA, assim como o DCAA, induziu tumores no fígado de ratos.

Porter *et al.* (2005) relaciona o risco do retardo do crescimento fetal em mulheres grávidas à exposição de cinco AHAs (MCAA, DCAA, TCAA, MBAA e DBAA), por meio da ingestão da água potável. Foi verificado um risco mais elevado pela exposição do MBAA, no segundo trimestre de gravidez.

Segundo a USEPA (2012), após estudos epidemiológicos e toxicológicos relacionados à investigação do potencial carcinogênico de algumas espécies de AHAs, constatou-se que o MCAA possui dados insuficientes para confirmação da sua toxicidade, enquanto o DCAA é susceptível a ser cancerígeno para os seres humanos e o TCAA indicou evidências sugestivas de potencial cancerígeno.

3.1.2 Legislação

Considerando-se os riscos à saúde gerados pelos contaminantes emergentes, órgãos governamentais vêm desenvolvendo pesquisas sobre estes compostos e desse modo regulamentam os limites máximos aceitáveis para tais, tendo em vista a qualidade da água para consumo humano.

Os AHAs foram regulamentados pela primeira vez em 1988 pela USEPA, na publicação “*National Primary Drinking Water Regulations: Disinfectants and Disinfection Byproducts*”, a qual definiu concentração máxima admissível para a soma de cinco AHAs (MCAA, DCAA, TCAA, MBAA, DBAA) de $60 \mu\text{g L}^{-1}$, valor ainda mantido (USEPA, 1998 a).

No ano de 2011, a Organização Mundial de Saúde estabeleceu no Guia de Qualidade para Água Potável, quarta edição, a concentração máxima para MCAA, DCAA e TCAA, de $20 \mu\text{g L}^{-1}$, $50 \mu\text{g L}^{-1}$ e $200 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, de acordo com o seu nível de toxicidade. Os valores de referência não foram estabelecidos para os demais AHAs, devido a reduzida quantidade de pesquisas comprobatórias do seu real risco a saúde (WHO, 2011).

As diretrizes para a qualidade da água potável no Canadá determinam para o somatório de cinco AHAs (MCAA, DCAA, TCAA, MBAA e DBAA), os mesmos compostos estabelecidos pela USEPA, o valor máximo aceitável de $80 \mu\text{g L}^{-1}$ (HEALTH CANADA, 2012).

Outros países estabelecem o valor máximo permitido para os AHAs individualmente, assim como a Austrália, que determina para o MCAA, DCAA e TCAA,

valores de $150 \mu\text{g L}^{-1}$, $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e $100 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (NATIONAL HEALTH AND MEDICAL RESEARCH COUNCIL, 2011). No Japão, as concentrações para esses compostos são regulamentados com valores de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ para o MCAA, $40 \mu\text{g L}^{-1}$ para o DCAA e $200 \mu\text{g L}^{-1}$ para o TCAA (JAPAN WATER WORKS ASSOCIATION, 2009).

Na União Europeia, a Diretiva 152/2017, relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano, adaptada da Diretiva 83/1998, que não instituiu concentrações de referência para os AHAs em água potável, passou a determinar valor paramétrico de $80 \mu\text{g L}^{-1}$ para todas as nove espécies (Decreto-Lei, 2017; HARMAN *et al.*, 2011).

No Brasil, os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade são determinados pelo Ministério da Saúde através das Portarias de Consolidação, as quais avaliam a qualidade da água potável destinada à ingestão, preparação e produção de alimentos e à higiene pessoal, independentemente da sua origem, de modo que não ofereça riscos à saúde. Essas portarias definem os valores máximos admissíveis para compostos de natureza química, física e microbiológica em água potável (BRASIL, 2017).

A primeira portaria de potabilidade da água criada no país foi a Portaria nº 56/1977, substituída pela Portaria nº 36/1990, a qual foi implementada em 1992. Em dezembro de 2000, a Portaria 36/1990 foi revogada, sucedida pela Portaria nº 1469/2000. No ano de 2004, foram realizadas modificações a última portaria, entrando em vigor a Portaria nº 518/2004 (LIMA, 2014).

Somente em 2011, houve a regulamentação dos AHAs no Brasil, através da Portaria nº 2914/2011, a qual defini concentrações máximas admissíveis dos AHAs totais de $80 \mu\text{g L}^{-1}$ em água para consumo humano. Em 2017, esta portaria foi revogada, sendo substituída pela Portaria nº 5/2017, que determina valor máximo permitido de $80 \mu\text{g L}^{-1}$ para a soma de sete AHAs (MCAA, DCAA, TCAA, MBAA, DBAA, BCAA, BDCAA) em água de abastecimento (BRASIL, 2011; BRASIL, 2017).

3.1.3 Métodos de Extração

Para a análise quantitativa dos subprodutos halogenados, geralmente é necessário uma etapa de pré-concentração dessas substâncias. A pré-concentração consiste na extração

dos analitos de interesse da amostra, por meio das técnicas de *Purge&Trap*, *Headspace*, microextração em fase sólida, extração em fase sólida e extração líquido-líquido, sendo estas as mais aplicadas na preparação de amostras de água contaminada por esses compostos (USEPA, 1995a; USEPA, 1995b).

No método *Purge & Trap*, também conhecido como *Headspace* dinâmico, a amostra é colocada em um frasco de purga e os compostos são volatilizados pela passagem de um gás inerte (He ou N₂) através da amostra, que os arrasta até o trap, onde são adsorvidos pelo seu material interno. Por aquecimento do trap, os compostos são dessorvidos e transferidos ao cromatógrafo gasoso (GC) pelo gás de arraste, onde são analisados (CHEN; HER, 2001; PROSEN; ZUPANCIC-KRALJ, 1999; WANG; CHEN, 2001).

A técnica *Headspace* é comumente utilizada para compostos em baixas concentrações, onde a amostra é inserida em um frasco e o analito, mais volátil que a amostra, se concentra em forma de vapor, após mudanças das condições de equilíbrio no interior do frasco. Uma fração desse vapor é retirada e analisada no GC sem a necessidade de pré-tratamento da amostra, sendo que os interferentes permanecem na matriz aquosa (PROSEN; ZUPANCIC-KRALJ, 1999).

A microextração em fase sólida consiste em uma extração simples e rápida, sem a utilização de solventes, onde os analitos presentes na amostra aquosa são extraídos por uma fibra capilar de sílica fundida revestida por uma fase estacionária adsorvente, a qual é inserida no GC para que ocorra a dessorção térmica e análise dos compostos (GALLARDO; COSTA; BARROSO, 2009; GONZÁLEZ; OCAMPO; LUBERT, 2011).

Método utilizado para compostos de menor volatilidade, a extração em fase sólida promove a remoção de interferentes da matriz, a concentração e isolamento dos analitos. A amostra é inserida no cartucho contendo um extrator de fase sólida, onde os analitos ficam retidos devido à afinidade com o material que o constitui e posteriormente são eluídos por um solvente adequado (SILVA, 2010).

A extração líquido-líquido consiste na separação dos compostos presentes na amostra pelas diferentes características de solubilidade frente a solventes orgânicos e aquosos. Ao introduzir o solvente orgânico na matriz aquosa, ocorre a separação das fases, na qual a fase orgânica onde estão contidos os analitos é extraída (BORGES, 2002).

3.1.4 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas é uma técnica analítica em que as moléculas da amostra são transformadas em íons livres em fase gasosa e separados pela razão da massa sobre a carga. O espectrômetro de massas acoplado a cromatografia gasosa é um detector com alta sensibilidade e seletividade, capaz de gerar informações sobre a composição elementar de amostras, a estrutura molecular, além de dados qualitativos e quantitativos de misturas complexas (CARERI e MANGIA, 2008; KARASEK; CLEMENT, 1988).

No cromatógrafo a gás, a coluna cromatográfica, considerada a fase estacionária, desempenha importante papel na separação dos compostos da amostra analisada, os quais são transportados para o detector através do gás de arraste. Este é considerado a fase móvel, geralmente utilizado para tal os gases hélio, nitrogênio ou hidrogênio (CARERI e MANGIA, 2008; PAVOM *et al.*, 2008).

A espectrometria de massas é composta pelos processos de ionização, separação das massas e registro dos íons formados. Após ser introduzida do cromatógrafo gasoso, a amostra é vaporizada no sistema de injeção operado a vácuo, sob altas temperaturas. Posteriormente, as moléculas são bombardeadas por um feixe de elétrons de alta energia. Os íons formados sofrem aceleração em um campo elétrico ou magnético e são separados pela razão massa/carga. No detector, o feixe de íons é convertido em sinal elétrico, por meio do modo de varredura, que caracteriza os íons através das massas monitoradas (KARASEK; CLEMENT, 1988; GROB, 2004).

Devido a sua grande sensibilidade, este método é comumente utilizado em análise de compostos em baixas concentrações, como, por exemplo, compostos orgânicos presentes na água relacionados à contaminação ambiental (NIKOLAOU *et al.*, 2002; CULEA; COZAR; RISTOIU, 2006).

3.1.5 Métodos para Quantificação Estabelecidos pela USEPA

Os contaminantes orgânicos geralmente são extraídos da amostra aquosa pelas técnicas de *Purge & Trap* e extração líquido-líquido (LLE) e determinados por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (GC-ECD) ou cromatografia gasosa acoplada a

espectrometria de massas (GC-MS), a qual é aplicada apenas para compostos voláteis e semi-voláteis (NETO; NUNES, 2003; NIKOLAOU *et al.*, 2005).

Devido a baixa volatilidade e alta polaridade dos AHAs, sua análise por cromatografia gasosa requer um processo de derivatização por esterificação dos seus grupos carboxílicos, tornando-os compostos mais voláteis (SARAJI; BIDGOLI, 2009).

Atualmente existem quatro métodos analíticos aprovados pela USEPA para o monitoramento dos AHAs, o Método USEPA 552.1, 552.2 e 552.3 e o Standard Methods 6251B, que utilizam metil *tert*-butil éter (MTBE) ou resinas de troca aniônica para extração dos AHAs da matriz aquosa e o diazometano ou metanol ácido para a sua conversão em ésteres. A análise desses contaminantes por esses métodos é realizada por GC-ECD, porém o método foi posteriormente adaptado para detecção por GC-MS (SARAJI; BIDGOLI, 2009; XIE, 2001).

3.1.5.1 Método USEPA 552.1

Este método se aplica a determinação dos AHAs em água potável, água subterrânea, água bruta e água em qualquer estágio de tratamento intermediário. De acordo o sumário do método da USEPA (1992):

A 100-mL volume of sample is adjusted to pH 5.0 and extracted with a preconditioned miniature anion exchange column. The analytes are eluted with small aliquots of acidic methanol and esterified directly in this medium after the addition of a small volume of methyl-tertbutyl ether (MTBE) as co-solvent. The methyl esters are partitioned into the MTBE phase and identified and measured by capillary column gas chromatography using an electron capture detector (GC/ECD). (USEPA, 1992, p. 3).

3.1.5.2 Método USEPA 552.2

Este método tem a mesma aplicabilidade que o método USEPA 552.1. O sumário do método determina:

A 40 mL volume of sample is adjusted to pH <0.5 and extracted with 4 mL of methyl-tert-butyl-ether (MTBE). The haloacetic acids that have been partitioned into the organic phase are then converted to their methyl esters by the addition of acidic

methanol followed by slight heating. The acidic extract is neutralized by a backextraction with a saturated solution of sodium bicarbonate and the target analytes are identified and measured by capillary column gas chromatography using an electron capture detector (GC/ECD). Analytes are quantitated using procedural standard calibration. (USEPA, 1995b, p. 3).

3.1.5.3 Método USEPA 552.3

Segundo o sumário do método disponível pela USEPA (2003), a extração é realizada da seguinte forma:

A 40-mL volume of sample is adjusted to a pH of 0.5 or less and extracted with 4 mL of either methyl tert-butyl ether (MTBE) or tert-amyl methyl ether (TAME) containing an internal standard. The haloacetic acids that have been partitioned into the organic phase are then converted to their methyl esters by the addition of acidic methanol followed by heating for 2 hours. The solvent phase containing the methylated haloacetic acids is separated from the acidic methanol by adding 7 mL of a concentrated aqueous solution of sodium sulfate. The aqueous phase is discarded. The extract is then neutralized with a saturated solution of sodium bicarbonate and the solvent layer is removed for analysis. The target analytes are identified and quantified by capillary column gas chromatography using an electron capture detector (GC/ECD). Analytes are quantified using procedural standard calibration. (USEPA, 2003, p. 3).

3.1.5.4 Standard Methods 6251B

A extração da amostra de água é realizada pelo reagente MTBE em um meio ácido e adicionado sulfato de sódio (Na_2SO_4), agente secante que aumenta a eficiência da extração. Após a extração, é realizada a metilação dos compostos por uma solução de diazometano, que os converte em ésteres metílicos ou outros ésteres derivados e posteriormente são determinados por GC-ECD (APHA, 2012).

3.2 Processos Oxidativos Avançados

Os Processos Oxidativos Avançados (POAs) têm sido aplicados com êxito na degradação de compostos orgânicos, apresentando eficácia no ponto de vista técnico, econômico e ambiental. Os POAs se baseiam na formação de radicais hidroxilas ($\bullet\text{OH}$), espécies altamente oxidantes, não seletivas e capazes de degradar compostos tóxicos e persistentes no meio. Eles são formados por radiação UV, agentes oxidantes fortes, como o

ozônio (O_3) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ultrassom, sais de ferro ou pelas diferentes combinações destes. Esses radicais convertem os poluentes, total ou parcialmente, em dióxido de carbono, água, ânions inorgânicos ou compostos com menor toxicidade e de mais fácil degradação que os seus precursores (PIGNATELLO, OLIVEROS; MACKAY, 2006; MORAIS; PERALTA-ZAMORA, 2005).

Segundo Tabrizi e Mehrvar (2004), os processos oxidativos vêm sendo empregados na degradação de compostos orgânicos halogenados formados na etapa de pré-cloração da água, no processo convencional de desinfecção. Uma grande vantagem do processo é a oxidação de contaminantes em baixas concentrações (ARAÚJO, 2008).

Os POAs são classificados em heterogêneos, quando há o uso de catalisadores sólidos, ou homogêneos, sem a presença desses catalisadores, além de poderem estar ou não sob irradiação (ARAÚJO, 2008; TEIXEIRA; JARDIM, 2004). Os principais POAs estão listados na Tabela 2.

Tabela 2 – Tipos de Processos Oxidativos Avançados

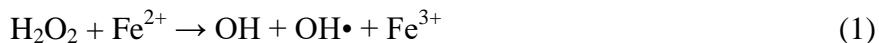
Processo	Homogêneo	Heterogêneo
Com irradiação	O_3/UV	
	H_2O_2/UV	Fotocatálise Heterogênea
	$O_3/H_2O_2/UV$	$TiO_2/O_2/UV$
	Foto-Fenton	
Sem irradiação	O_3/HO^\cdot	$O_3/catalisador$
	O_3/H_2O_2	Fe^{2+}/H_2O_2

FONTE: Adaptado de Souza (2010).

3.2.1 Processo Fenton

Dentre os POAs Químicos, destaca-se o processo Fenton, que consiste na decomposição do H_2O_2 catalisada por íons ferrosos (Fe^{3+}) ou férricos (Fe^{2+}) em meio ácido, levando a formação de radicais hidroxilas. O processo ocorre como descrito na Equação (1). A oxidação pode ocorrer de forma direta ou indireta, pela formação de radicais hidroxilas ou

decomposição dos compostos orgânicos pelos íons Fe^{3+} e Fe^{2+} , respectivamente (BRILLAS; SIRES, OTURAN, 2009).



O potencial de uso desse processo na degradação dos compostos orgânicos se deve as inúmeras vantagens, dentre as quais se destacam simplicidade do processo, a grande variedade de compostos ao qual se aplica, custo relativamente baixo, abundância de sais de ferro disponíveis, não utiliza reagentes tóxicos, não gera resíduos e nem produtos tóxicos, além da reação ocorrer à temperatura e pressão ambientes (BAUTISTA *et al.*, 2008; NOGUEIRA *et al.*, 2007).

3.2.1.1 Nanopartículas Catalisadoras

Desde o início deste século, a nanotecnologia tem gerado grande interesse, devido ao seu potencial de aplicação em várias áreas, como a remediação ambiental, purificação e dessalinização da água. A nanotecnologia desenvolve materiais com dimensões extremamente pequenas, denominadas nanomateriais, devido a sua ordem nanométrica. Essas nanopartículas apresentam propriedades físico-químicas distintas das macropartículas (SALAMANCA-BUENTELLO *et al.*, 2005; SINGER, SALAMANCA-BUENTELLO; DAAR, 2005).

As nanopartículas têm sido utilizadas para fins de remediação ambiental, aplicada como uma alternativa benéfica das práticas atuais, para a remoção de uma grande variedade de contaminantes emergentes, promovendo redução dos custos, maior eficiência de descontaminação da água e com menores tempos de aplicação (KARN; KUIKEN; OTTO, 2009; SACCOCCIO; ZEITUNE; MORAES, 2010).

Segundo Saccoccio *et al.* (2010), as nanopartículas possuem excelentes propriedades de adsorção de metais e compostos orgânicos, devido a sua extensa área superficial. As propriedades magnéticas de algumas nanopartículas facilitam a sua remoção do meio aquoso. Ainda não há muitos estudos que quantificam seus riscos potenciais, ecotoxicidade, biodisponibilidade e persistência meio ambiente (KARN; KUIKEN; OTTO, 2009).

Dentre as nanopartículas metálicas utilizadas para descontaminação da água, o ferro vem sendo alvo de vários estudos nas últimas décadas. Dentre as vantagens das nanopartículas de ferro, podem-se observar maiores taxas de descontaminação, redução eficiente de ampla variedade de contaminantes e extensa área de contato, o que favorece a reatividade com outros compostos na sua superfície. Além disso, testes laboratoriais comprovam a totalidade na remoção dos nanomateriais em amostras aquosas após sua utilização, devido as suas propriedades magnéticas (KANEL; GREENECHE; CHOI, 2006; ELLIOTT; LIEN; ZHANG, 2008).

As nanopartículas magnéticas se diferenciam por suas propriedades físico-químicas, relacionadas à estrutura cristalina, morfologia e tamanho das partículas, que variam de acordo com o método de síntese utilizado e o controle de seus parâmetros, como pH, temperatura e concentração de reagentes. A superfície de contato e a dimensão do nanomaterial tem influência direta na sua propriedade magnética (KNOBEL, 2000; LU; SALABAS; SCHÜTH, 2007).

A magnetita (Fe_3O_4) se destaca dentre as nanopartículas de óxidos metálicos, classificada como um mineral ferrimagnético composta por íons de Fe^{2+} e Fe^{3+} . Devido a simples estrutura, é facilmente sintetizada pela neutralização de uma solução aquosa contendo íons férricos e ferrosos com uma solução alcalina de NaOH (BATLLE; LABARTA, 2002; GUBIN *et al.*, 2005; SUN *et al.*, 2004).

3.3 Teste *Allium cepa*

Dentre os métodos de avaliação da toxicidade causada pela exposição a contaminantes, o teste de *Allium cepa* é comumente utilizado como bioensaio para o monitoramento ambiental (BARBÉRIO *et al.*, 2009; BIANCHI; MANTOVANI; MARIN-MORALES, 2015; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

O teste de *Allium cepa* foi desenvolvido por Levan em 1938 e é baseado no estudo cromossômico das células meristemáticas das raízes de *Allium cepa*, a fim de determinar o potencial mutagênico, genotóxico e citotóxico de produtos químicos, dejetos industriais e principalmente águas contaminadas. À décadas vem sendo utilizado para a avaliação da toxicidade de diversas substâncias e seus efeitos nocivos ao meio ambiente e a saúde humana

(CUCHIARA; BORGES; BOBROWSKI, 2012; DEBNATH, MONDAL, HAJRA, 2018; MANGALAMPALLI; DUMALA; GROVER, 2018).

Este bioensaio constitui na análise de parâmetros macroscópicos (como o crescimento das raízes de *Allium cepa* e deformidades) e microscópicos (a exemplo dos danos cromossômicos, alteração no índice mitótico e formação de micronúcleos, nas células meristemáticas) das raízes da espécie em questão (BARBÉRIO *et al.*, 2009; DEBNATH, MONDAL, HAJRA, 2018). Estudos comprovam sua eficiência e confiabilidade na análise de poluentes ambientais, considerado um teste simples, devido ao fácil manuseio, à sua taxa de proliferação característica, alto número de células em divisão e cromossomos grandes e em número reduzido ($2n = 16$), o que facilita a avaliação de danos cromossômicos e distúrbios no ciclo de divisão celular (BIANCHI; MANTOVANI; MARIN-MORALES, 2015; LEME; MARIN-MORALES, 2009; MATSUMOTO *et al.*, 2006).

A identificação de aberrações cromossômicas nas células expostas a agentes químicos induz a genotoxicidade destes contaminantes. Tais anomalias estão relacionadas ao maior risco de desenvolvimento de câncer, de acordo com estudos epidemiológicos. Autores relataram que as alterações cromossômicas mais frequentemente observadas foram c-metáfases, quebras e trocas cromossômicas e pontes. A presença de micronúcleo nas células é sugestiva da mutagenicidade dos contaminantes ao qual foram expostas, gerados por danos ao material genético, como clastogenia (quebra de cromossomos) ou aneugenia (perda de cromossomos) (MATSUMOTO *et al.*, 2006; VALENTIN-SEVERIN *et al.*, 2003).

O *United Nations Environment Programme* (UNEP) e o *International Programme on Chemical Safety* (IPCS) certificaram o ensaio *Allium cepa* como um teste eficaz no monitoramento *in situ* de contaminantes ambientais, substâncias e produtos químicos (MANGALAMPALLI; DUMALA; GROVER, 2018). Dessa forma, o monitoramento de águas tratadas, águas superficiais e efluentes diversos utilizando o bioensaio *Allium cepa* foi relatado por vários autores, para a detecção das ações dos compostos químicos presentes na água (BARBÉRIO *et al.*, 2009; FERETTI *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2013; SMAKAKINCLL *et al.*, 1996).

Referências

- APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd edition, p. 1496, 2012.
- ARAUJO, F. V. F. Estudo do Processo Fenton Heterogêneo Utilizando Hematita (Fe_2O_3) como Catalisador na Descoloração de Soluções de Corante Reativo. Tese de Doutorado. Escola de Química, UFRJ, 2008.
- BARBÉRIO, A. et al. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of water from the River Paraíba do Sul, in Brzil, with the *Allium cepa* L. test. **Brazilian Journal of Biology.**, v. 69, n. 3, p. 837–842, 2009.
- BATLLE, X.; LABARTA, A. Finite-size effects in fine particles: Magnetic and transport properties. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 35, p. 15–42, 2002.
- BAUTISTA, P. et al. An overview of the application of Fenton oxidation to industrial wastewaters treatment. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, v. 83, p. 1323–1338, 2008.
- BELLAR, T. A. LICHTENBERG, J. J.; KRONER, R. C. The occurrence of organohalides in chlorinated drinking water. **Journal American Water Environment Research**, v. 66, n.12, p. 703–706, 1974.
- BIANCHI, J; MANTOVANI, M. S.; MARIN-MORALES, M. A. Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. **Journal of Environmental Sciences**, v. 36, p. 112–111, 2015.
- BORGES, J. T. A utilização da técnica MIMS na determinação de trihalometanos em águas de abastecimento e a influência do íon brometo, da amônia e de algas na formação desses compostos. Campinas: 2002. (Tese de Doutorado), Faculdade de Engenharia Civil, Unicamp, 2002.
- BRASIL. Portaria Ministério da Saúde nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União.
- BRASIL. Portaria Ministério da Saúde nº 05, de 28 de setembro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União.
- BRILLAS, E.; SIREs, I.; OTURAN, M. A. Electro-Fenton process and related electrochemical technologies based on Fenton's reaction chemistry. **Chemical Reviews**, v. 109, p. 6570–6631, 2009.

CARDADOR, M. J.; SALGUERO, J. F.; GALLEGO, M. Simultaneous quantification of trihalomethanes and haloacetic acids in cheese by on-line static headspace gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1408, p. 22–29, 2015.

CARERI, M.; MANGIA, A. Trends in analytical atomic and molecular mass spectrometry in biology and the life sciences. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 8, p. 2585–2595, 2011.

CHEN, T., HER, G. On-line monitoring of trihalomethanes in drinking water using continuous-flow purge and cryofocusing gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 927, p. 2293–232, 2001.

CHIAVELLI, L. U. R. Ácidos Haloacéticos em água potável: a formação de subprodutos da desinfecção durante o tratamento da água. Maringá: Novas Edições Acadêmicas, 2014.

CUCHIARA, C. C.; BORGES, C. D. S.; BOBROWSKI, V. L. Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos da água. **Tecnologia & Ciências Agropecuária**, v. 6, n. 1, p. 33–38, 2012.

CULEA, M.; COZAR, O.; RISTOIU, D. Methods validation for the determination of trihalomethanes in drinking water. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 41, p. 1594–1597, 2006.

DEBNATH, P.; MONDAL, A.; HAJRA, A. Cytogenetic effects of silver and gold nanoparticles on *Allium cepa* roots. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 2018.

Decreto - Lei nº 152/2017, relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano. Diário da República Nº 235, 1ª série, 2017-12-07. p. 6555–6576.

ELLIOTT, D. W.; LIEN, H. L.; ZHANG, W. X. Zerovalent iron nanoparticles for treatment of ground water contaminated by hexachlorocyclohexanes. **Journal of Environmental Quality**, v. 37, p. 2192–2201, 2008.

ESTEVES, L. C. R. et al. A fast and environment-friendly method for determination of chemical oxygen demand by using the heterogeneous Fenton-like process (H₂O₂/Fe³⁺-x-CoxO₄ nanoparticles) as an oxidant. **Talanta**, v. 135, p. 75–80, 2015.

FERETTI, D. et al. Ground and surface water for drinking: A laboratory study on genotoxicity using plants test. **Journal of Publication Health Research**, v.1, p. 31-37, 2012.

GALLARDO, E.; COSTA, S.; BARROSO, M. A microextração em fase sólida como técnica de preparação de amostras em química analítica e toxicologia: teoria e aplicações. **Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde**, v. 6, p. 105–124, 2009.

GEISSEN, V. et al. Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. **International Soil and Water Conservation Research**, v. 3, n. 1, p. 57–65, 2015.

GONZÁLEZ, M., OCAMPO, G., LUBERT, C. Optimization of the HS-SPME technique by using response surface methodology for evaluating chlorine disinfection by-products by GC in drinking water. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 12, p. 1–7, 2011.

GROB, R. L. Modern Practice of gas chromatography. 4. ed. Hoboken (US): John Wiley & Sons, 2004.

GUBIN, S. P. et al. Magnetic nanoparticles: preparation, structure and properties. **Russian Chemical Reviews**, v. 74, n. 6, p. 489–520, 2005.

HARMAN, M.; RUMSBY, P.; KANDA, R. Evaluation of Haloacetic Acid Concentrations in Treated Drinking Water. Wrc Plc, 2011, 83 p.

HEALTH CANADA. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality - Summary Table. Ottawa, 2012.

HONG, Y.; SONG, H.; KARANFIL, T. Formation of haloacetic acids from dissolved organic matter fractions during chloramination. **Water Research**, v. 47, n. 3, p. 1147–1155, 2013.

IARC (1987) Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs volumes 1–42. Lyon, International Agency for Research on Cancer, pp. 100–106 (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Supplement 7).

JAPAN WATER WORKS ASSOCIATION. Japan Water Supply Data Report: april 2007 – march 2008. JWWA, 2009.

KANEL, S. R., GREENECHE J. M., CHOI H. Arsenic (V) removal from groundwater using nanoscale zerovalent iron as a colloidal reactive barrier material. **Environmental Science & Technology**. v. 40, p. 2045–2050, 2006.

KARASEK, F. W.; CLEMENT, R. E. Basic gas chromatography – mass spectrometry. 1. ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1988.

KARN, B.; KUIKEN, T.; OTTO, M. Nanotechnology and in situ remediation: A review of the benefits and potential risks. **Environmental Health Perspectives**, v. 17, n. 12, p. 1813–1831, 2009.

KNOBEL, M. Os superpoderes dos nanomagnetos. **Ciência Hoje**, v. 27, n. 159, p. 32–38, 2000.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71–81, 2009.

LIMA, G. M. Desenvolvimento de correlação da formação de ácidos haloacéticos em água contendo substância húmica oxidada com cloro. 2014. 109f. Dissertação (Mestrado Profissionalizante em Tecnologia Ambiental) – Centro de Ciências Exatas, Naturais e Tecnologias da Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2014.

LINDER, R. E. et al. Spermatotoxicity of dichloroacetic acid. **Reproductive Toxicology**, p. 681–688. 1997.

LIU, Y.; MOU, S. Determination of bromate and chlorinated haloacetic acids in bottled drinking water with chromatographic methods. **Chemosphere**, v. 55, n. 9, p. 1253–1258, 2004(a).

LIU, Y.; MOU, S. Determination of trace-levels of haloacetic acids in drinking by ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1039, p. 89–95, 2004(b).

LOOS, R.; BARCELÓ, D. Determination of haloacetic acids in aqueous environments by solid-phase extraction followed by ion-pair liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 938, p. 45–55, 2001.

LU, A. H.; SALABAS, E. L.; SCHÜTH, F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. **Angewandte Chemie - International Edition**, 2007.

MANGALAMPALLI, B.; DUMALA, N.; GROVER, P. *Allium cepa* root tip assay in assessment of toxicity of magnesium oxide nanoparticles and microparticles. **Journal of Environmental Sciences**, v. 66, p. 125–137, 2018.

MATSUMOTO, S.T. et al. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleos test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 148–158, 2006.

MORAIS, J. L.; PERALTA-ZAMORA, P. Use of advanced oxidation processes to improve the biodegradability of mature landfill leachates. **Journal of Hazardous Materials**, v. 123, n. 1–3, p. 181–186, 2005.

NATIONAL HEALTH AND MEDICAL RESEARCH COUNCIL. National water quality management strategy – Australian drinking water guidelines. 2011.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (NTP). Toxicology and carcinogenesis studies of dibromoacetic acid. US. Department of Health and Human service. Estados Unidos, 2007.

NETO, F. R. A.; NUNES, D. S. S.; Cromatografia, Princípios Básicos e Técnicas Afins. Rio de Janeiro, Interciência, 2003. 187 p.

NIKOLAOU, A. D. et al. Application of different analytical methods for determination of volatile chlorination byproducts in drinking water. **Talanta**, v. 56, p. 717–726, 2002.

NIKOLAOU, A. et al. Optimization of analytical methods for the determination of DBPs: Application to drinking waters from Greece and Italy. **Desalination**, v. 176, p. 25–36, 2005.

NOGUEIRA, R. F. P. et al. Fundamentos e aplicações ambientais dos processos fenton e foto-fenton. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p.400–408, 2007.

PAVON, J. L. P. et al. Determination of trihalomethanes in water samples: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 629, p. 6–23, 2008.

PEREIRA, M. A.; PHELPS, J. B. Promotion by dichloroacetic acid and trichloroacetic acid of N-nitrosourea-initiated cancer in the liver of female B6C3F1 mice. **Cancer Letters**. Estados Unidos, p. 133–141, 1996.

PETRIE, B.; BARDEN, R.; KASPRZYK-HORDERN, B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. **Water Research**, v. 72, p. 3–27, 2014.

PETROVIĆ, M.; GONZALEZ, S.; BARCELÓ, D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 685–696, 2003.

PHAC. PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA. Chlorination disinfection by-products (DBPs) in drinking water and public health in Canada. A Primer for Public Health Practitioners Reviewing Evidence form over 30 years of Research. Alberta, Canadá, 2008.

PIGNATELLO, J. J.; OLIVEROS, S. E.; MACKAY, A. Advanced oxidation processes of organic contaminant destruction based of the Fenton reaction and related chemistry. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 36, p. 1–84, 2006.

PORTER, C. K. et al. The effect of trihalomethane and haloacetic acid exposure on fetal growth in a maryland county. **American Journal of Epidemiology**, v. 162, p. 334–344, 2005.

PROSEN H., ZUPANCIC-KRALJ L. Solid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 4, p. 272–273, 1999.

ROOK, J. J. Chlorination Reactions of Fulvic Acids in Natural Waters. **Environmental Science & Technology. Holanda**, v. 11, n. 5, p. 478–482, 1974.

SACCOCCIO, E. M.; ZEITUNE, C. P. M.; MORAES, S. L. Nanotecnologia e o meio ambiente: Nanopartículas metálicas no tratamento de águas e solos contaminados por organoclorados. **Environmental Health**, v. 1, n. 3, p. 3–5, 2010.

SALAMANCA-BUENTELLO, F. et al. Nanotechnology and the Developing World. **PLoS Medicine**, v. 2, n. 5, p. 1–14, 2005.

SARAJI, M.; BIDGOLI, A. A. H. Single – drop microextraction with in – microvial derivatization for the determination of haloacetic acids in water sample by gas chromatography – mass spectrometry. **Journal of Chromatography A.**, v. 1216, p. 1059–1066, 2009.

SCHULTE, P. et al. H_2O_2 / O_3 , H_2O_2 / UV And H_2O_2 / Fe^{2+} Processes For The Oxidation Of Hazardous Wastes. **Ozone: Science & Engineering**, v. 17, n. 2, p. 119–134, 1995.

SILVA, C. P. Determinação de ácidos haloacéticos em Água utilizando técnicas cromatográficas. 2010, 78f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de PósGraduação em Química, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

SILVA, G. H. et al. Mutagenicidade e genotoxicidade em águas superficiais e subterrâneas. **Holos Environment**, v. 13, n. 1, p. 64–73, 2013.

SINGER, P.; SALAMANCA-BUENTELLO, F.; DAAR, A. Harnessing nanotechnology to improve global equity. **Issues in Science and Technology**, v. 21, n. 4, 2005.

SMAKA-KINCL, V. et al. The evaluation of waste, sueface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Researc**, v. 368, p.171–179, 1996.

SMITH, M. K. et al. Teratogenic activity of trichloroacetic acid in the rat. **Teratology**, p. 445–451. 1989.

SOUZA, B. M. Avaliação De Processos Oxidativos Avançados Acoplados Com Carvão Ativado Granulado Com Biofilme Para Reúso De Efluentes De Refinaria De Petróleo. COPPE/UFRJ, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2010.

SUN, S. et al. Monodisperse MFe_2O_4 (M = Fe, Co, Mn) nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 1, p. 273–9, 2004.

TABRIZI, G. B.; MEHRVAR, M. Integration of advanced oxidation technologies and biological processes: recent developments, trends, and advances. **Journal of Environmental Science And Health**, v. 39, n. 11-12, p. 3029–3081, 2004.

TEIXEIRA, C. P. A. B.; JARDIM, W. F. *Processos Oxidativos Avançados: conceitos teóricos*. Caderno temático, v. 3, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Química - IQ, Laboratório de Química Ambiental - LQA. Agosto de 2004.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Method 552.1 - Determination of haloacetic acids and dalapon in drinking water by ion-exchange liquid-solid extraction and gas chromatography with an electron capture detector. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, 1992.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Method 551.1. Determination of chlorination disinfection byproducts, chlorinated solvents, and halogenated pesticides/herbicides in drinking water by liquid-liquid extracion and gas chromatografhy with electron-capture detection. U.S. Environmental Protection Agency, Ohio, USA, 1995(a).

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Method 552.2. Determination of haloacetic acids and dalapon in drinking water by liquid-liquid extraction, derivatization and gas chromatography with electron capture detection. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, Ohio, USA, 1995(b).

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). National Primary Drinking Water Regulations: Disinfectants and Disinfection Byproducts. v. 63, n. 241, p. 69390 – 6947, 1998(a).

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Method 552.3 - Determination of haloacetic acids and dalapon in drinking water by liquid-liquid microextraction, derivatization, and gas chromatography with electron capture detection. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 2003.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories. Washington, 2012.

VALENTIN-SEVERIN, I. et al. Use of HepG2 cell line for indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleos assays. **Mutation Research**, v. 536, p. 79–90, 2003.

WANG, J. L.; CHEN, W. K. Construction and validation of automated purge and trap gas chromatography for the determination of volatile organic compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 927, p. 143–154, 2001.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for Drinking-water Quality, v.1. 4^a ed. Geneva, 2011.

XIE, Y. Analyzing Haloacetic Acids Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **Water Research**, v. 35, n. 6, p. 1599–1602, 2001.

XIE, Y. F. Disinfection byproducts in drinking water: Formation, analisys and control. Estados Unidos: Crc Press Llc, 2004. 176 p.

CAPÍTULO 2

Degradation of haloacetic acids with the Fenton-like method catalysed by magnetite doped with cobalt and analysis by Gas Chromatography-Mass Spectrometry

Amanda Oliveira Mourão^a, Diego Francis Silva^a, Mariandry Del Valle Rodriguez Rodriguez^a, Thamyris Souza Torres^a, Elton Santos Franco^a, Márcia Cristina da Silva Faria^a, Luiz Fernando Oliveira Maia^a, Jairo Lisboa Rodrigues^{a*}

Instituto de Ciência, Engenharia e Tecnologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Teófilo Otoni, MG, 39803-371, Brazil.

*jairo.rodrigues@ufvjm.edu.br

ABSTRACT

A method was developed to evaluate the degradation capacity of HAAs in water by the Fenton-like process catalyzed by magnetite doped with cobalt nanoparticles ($\text{Fe}_{3-x}\text{Co}_x\text{O}_4$), with extraction of these contaminants by liquid-liquid extraction (LLE) and the analysis by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC-MS). The method developed was efficient in the degradation of HAAs, with better degradation values of 62.5%, 61.57%, 30.01%, 38.96%, 36.83%, 50.23%, 83.5%, 40.72% and 78.97% for the compounds monochloroacetic acid (MCAA), monobromoacetic acid (MBAA), dichloroacetic acid (DCAA), trichloroacetic acid (TCAA), bromochloroacetic acid (BCAA), dibromoacetic acid (DBAA), bromodichloroacetic acid (BDCAA), dibromochloroacetic acid (DBCAA) and tribromoacetic acid (TBAA), respectively. Through the application of the *Allium cepa* test, the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of HAAs were evaluated. The results confirm its genotoxic and mutagenic effects on *Allium cepa* meristematic cells. Through this study, it was possible to verify the effectiveness of the developed method and its potential as a proposal for environmental remediation.

Keywords: Haloacetic acids, Fenton-Like, magnetite doped with cobalt, liquid-liquid extraction, water treatment, bioassay.

1. Introduction

The water is an indispensable natural resource for the survival of all species, of extensive environmental, social and economic value, fundamental for diverse activities, such as agriculture, industry and human consumption. However, these activities and the creation of new chemicals included in them, endanger the quality of water, causing environmental contamination (Geissen et al. 2015).

In the last decades, studies on emerging contaminants have become a subject of great environmental relevance because they are potentially toxic to the environment and human health, producing adverse effects to exposed organisms, even at low concentrations (of the order $\mu\text{g L}^{-1}$ and ng L^{-1}), mainly derived from the discharge of urban wastewater (Geissen et al. 2015; Petrie, Barden and Kasprzyk-Hordern 2014).

The haloacetic acids (HAAs) are chlorinated and / or brominated organic halogen compounds belonging to the class of chemical oxidation by-products, being one of the most abundant by-products formed in the pre-chlorination process for water purification in Water Treatment Plant, from the reaction of the chlorine with the organic matter present in water. This class of halogenated organic by-products consists of nine compounds: monochloroacetic acid (MCAA), dichloroacetic acid (DCAA), trichloroacetic acid (TCAA), monobromoacetic acid (MBAA), dibromoacetic acid (DBAA), tribromoacetic acid (TBAA), bromochloroacetic acid (BCAA), bromodichloroacetic acid (BDCAA), dibromochloroacetic acid (DBCAA). (Chiavelli 2014; Hong, Song and Karanfil 2013; Xie 2001).

Due to the potential health risks, the *Portaria de Consolidação* nº 05 of 28/09/2017 (Brasil 2017), which establishes the Brazilian standards of potability, defined the maximum value allowed for the sum of seven HAAs (MCAA, DCAA, TCAA, MBAA, DBAA, BCAA, BDCAA) and DALAPON in treated water of $80 \mu\text{g L}^{-1}$. The US Environmental Protection Agency (USEPA) regulates a maximum contamination of $60 \mu\text{g L}^{-1}$ to the sum of five HAAs (MCAA, DCAA, TCAA, MBAA and DBAA) in treated water. Therefore, the World Health Organization (WHO) defined these values at $20 \mu\text{g L}^{-1}$, $50 \mu\text{g L}^{-1}$ e $200 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively, for the MCAA, DCAA and TCAA (Liu and Mou 2004a; WHO 2011).

Epidemiological studies point to the high risk potential carcinogenic and mutagenic of HAAs in humans (Lima 2014). Cytogenetic studies have shown that individuals

with elevated cytogenetic alterations have a higher risk of developing cancers. Therefore, tests with living organisms or bioassays are important to predict the possible risks to human and environmental health. The *Allium cepa* test is considered an efficient bioindicator of substances with genotoxic and mutagenic potential, as it evaluates the chromosomal alterations and aberrations generated by contaminants in meristematic cells, through studies of cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity. It is a favorable test due to the rapid growth of the root, reduced number of chromosomes with considerable size, which facilitates its visualization and analysis (Leme and Marin-Morales 2009).

Considering the potential impact of organic contaminants, it is essential to develop methods that can be used in the degradation of these pollutants in the treatment of water from Water Treatment Plant. An alternative for the degradation of these contaminants is by Advanced Oxidation Processes (POAs), in which the formation of highly reactive hydroxyl radicals ($\bullet\text{OH}$) oxidize organic matter. Among the various types of POAs, the Fenton process stands out as a simple, fast, sustainable and cost-effective method. Among the iron oxides used in the process as catalysts, magnetite doped with cobalt ($\text{Fe}_{3-x}\text{Co}_x\text{O}_4$) has a higher degree of Fenton activity (Esteves et al. 2015; Schulte et al. 1995).

According to Esteves et al. (2015), the Fenton process using magnetite Co-doped is based on the oxidation of organic matter by the $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}_{3-x}\text{Co}_x\text{O}_4$ system, where nanoparticle catalysts $\text{Fe}_{3-x}\text{Co}_x\text{O}_4$ in the presence of H_2O_2 generate a highly oxidizing system due the formation of hydroxyl radicals, in which the organic compounds present in the water are oxidized. Due to its magnetic properties, the nanoparticle can be easily recovered and reused in subsequent organic matter degradation processes.

Based on these aspects, an efficient and low-cost method for HAAs degradation was developed by the Fenton process with magnetite Co-doped. The extraction of these compounds from the aqueous matrix by Liquid-Liquid Extraction (LLE) and GC-MS process monitoring. For the evaluation of a possible biological effect, the *Allium cepa* test was performed as a genotoxic and mutagenic indicator test organ of the HAAs, through the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity studies of these contaminants.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

All reagents used were of analytical-reagent grade. High purity deionized water (resistivity 18.2 M Ω cm) obtained using a water purification system from Thermo Scientific Barnstead Nanopure. Certified Standards (Certified Reference Material TraceCERT®) for MCAA, DCAA, TCAA, MBAA, DBAA, TBAA, BCAA, BDCAA and DBCAA (49107-U, TraceCERT®) and the internal standard 1,2,3-Trichloropropane (47669-U, TraceCERT), both in Methanol (SIGMA). Methyl tert-butyl ether (MTBE, SIGMA), Sulfuric Acid (ISO FAR), Copper Sulphate (SIGMA) and Sodium Sulphate (SIGMA) were used in the LLE. Hydrogen Peroxide (IMPEX) was used in the Fenton process.

2.2 Synthesis of Fe_{3-x}Co_xO₄ Nanoparticles

The Fe_{3-x}Co_xO₄ nanoparticles were synthesized according to Esteves et al. (2015), by coprecipitation of Fe²⁺, Fe³⁺ and Co²⁺ ions by NaOH in aqueous solution. 4.8219 g of NH₄Fe(SO₄)₂·12H₂O, 7.8428 g of (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O and 0.2379 g of CoCl₂·6H₂O were solubilized in 100 mL of ultrapure water and precipitated with 100 mL of 0.1 M NaOH under vigorous stirring for 30 minutes at room temperature to form Fe_{3-x}Co_xO₄. The formed black precipitate was transferred to tubes Falcon of 50 mL, centrifuged and washed several times with ultrapure water and subsequently dried in a vacuum desiccator at room temperature.

2.3 Characterization of Magnetite Co-doped Nanoparticles

The prepared material (Fe_{3-x}Co_xO₄) was characterized by Transmission Electron Microscopy (TEM). The morphology of the materials produced was monitored by TEM using a transmission electron microscope, model JEOL JEM 2000EXII, performed at the Laboratório de Caracterização de Materiais of the Instituto de Ciências Exatas of the UFMG.

2.4 *Allium cepa* Test

According to Grant (1982), Leme and Marin-Morales (2008) and Bianchi, Mantovani and Marin-Morales (2015), with modifications, cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity were studied by the *Allium cepa* test. The negative control (C⁻) was done with ultrapure water.

Were transferred to each Petri dish with filter paper, 100 seeds of *Allium cepa*, moistened with ultrapure water and germinated until they reached a root length of 1 cm. Subsequently, they were exposed to water samples prepared with HAAs standards at a concentration of 5 ppb and 150 ppb, before and after degradation (PD), and water samples prepared with 1.2% (w/v) magnetite, all made in duplicates, submitted to germination for 24 hours. After that period, the roots were cut and fixed with Carnoy solution (3 ethanol: 1 acetic acid) in eppendorf tubes for 6 hours. The Carnoy solution was then replaced with 1 mL of 70% ethanol and maintained for 6 hours. Subsequently, replaced with a new solution of 70% ethanol and stored in the refrigerator until the analysis.

For the preparation of the slides, the roots were washed with ultrapure water three times. They were then subjected to acid hydrolysis with 1 M HCl solution at 60 °C in a water bath for 9 minutes. After the acid hydrolysis, the roots were transferred to eppendorf tubes containing the Schiff reagent (Merck, USA) and reverted with aluminum foil for 2 h. Subsequently, the hood was cut, placed on a slide and added with a drop of 2% acetic Carmin. After 8 minutes, the hood was covered with cover slips and carefully squashed.

2.5 Degradation of HAAs by the Fenton process catalyzed by Fe_{3-x}Co_xO₄

The method of HAAs degradation proposed in this work was based on the method of Esteves et al. (2015), with modifications. Initially, an experimental planning was developed to optimize the degradation method, determining the influence of the variables in the process, through several tests, to obtain the conditions that generated the highest rate of degradation of the compounds. Thus, HAAs standard aliquots were prepared in a 50 mL volumetric flask at a concentration of 100 µg L⁻¹ and transferred to 100 mL amber flasks. The amount of the Fe_{3-x}Co_xO₄ nanoparticle added to the amber flask containing the standard varied in 200, 400 and 600 mg. The pH was corrected with 0.1 M HCl and 0.1 M NaOH, with the aid of the pH meter, varying in 3, 5 and 7. Subsequently, a varied amount of H₂O₂ was added in each test,

between 200, 400 and 600 μL . The samples were then shaken for 10 minutes in the shake at a speed of 300 rpm. Subsequently, the nanoparticles were separated from the sample with the aid of a magnet, deposited at the bottom of the amber bottle. Then, the LLE of the HAAs of the samples was performed and analyzed by GC-MS.

2.6 Extraction of Haloacetic Acids

The process of extraction of HAAs from water samples for their determination was performed according to the LLE method validated in procedures that preceded these analyzes, in a study to be published, with modifications, as detailed in the flow chart of Figure 1. To each amber flask containing 50 mL of the degraded HAAs standard, were inserted 12 g of Na_2SO_4 and 2 g of CuSO_4 and stirred until complete dissolution of both salts. Then 1 mL of sub-distilled H_2SO_4 , 50 μL of internal standard (1,2,3-trichloropropane) and 3.5 mL of MTBE were added immediately and stirred vigorously for 3 min and immediately placed in a freezer for 5 min. Two distinct phases were formed, corresponding to an aqueous phase at the bottom and an organic phase at the top of the flask, where the organic phase was extracted into a 10 mL amber flask, methylated by the addition of 1 mL of 10% methanolic H_2SO_4 solution and kept in a 50°C water bath for 2 hours. Subsequently, the sample was taken to the freezer for 10 min. Thereafter, the sample was cleaned with 4 mL of the 10% Na_2SO_4 solution, shaken for 2 min and kept in the freezer for 5 min. The organic phase formed on the top of the flask was transferred to a vial and stored in the freezer until GC-MS analysis.

2.7 Instruments and Chromatographic Conditions

Chromatographic analyzes were performed by a Gas Chromatography / Mass Spectrometry (GC-MS) CLARUS 680 SQ 8 PerkinElmer (USA), under optimized conditions. 3 μL of sample was injected in splitless mode and separated by a ZEBRON ZB-5MS capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm - 5% Polysilarylene - 95% Polydimethylsiloxane). The temperature of the injector at 200 °C, helium was used as the carrier gas with high purity (99.9995%) and 1.0 mL min^{-1} flow. The oven was programmed isothermally at 35°C for 1 min and then increased to 40°C at 1°C min^{-1} , followed by heating at 30°C min^{-1} to 200°C. The mass spectrometer was used in the electron impact mode (EI +). The solvent cut-off time was 3 min with an acquisition rate of 0.35 s scan^{-1} , m/z 45–260 were scanned and 70 eV electronic

impact ionization mode. The transfer line temperature was 200°C and the trap temperature was 180°C.

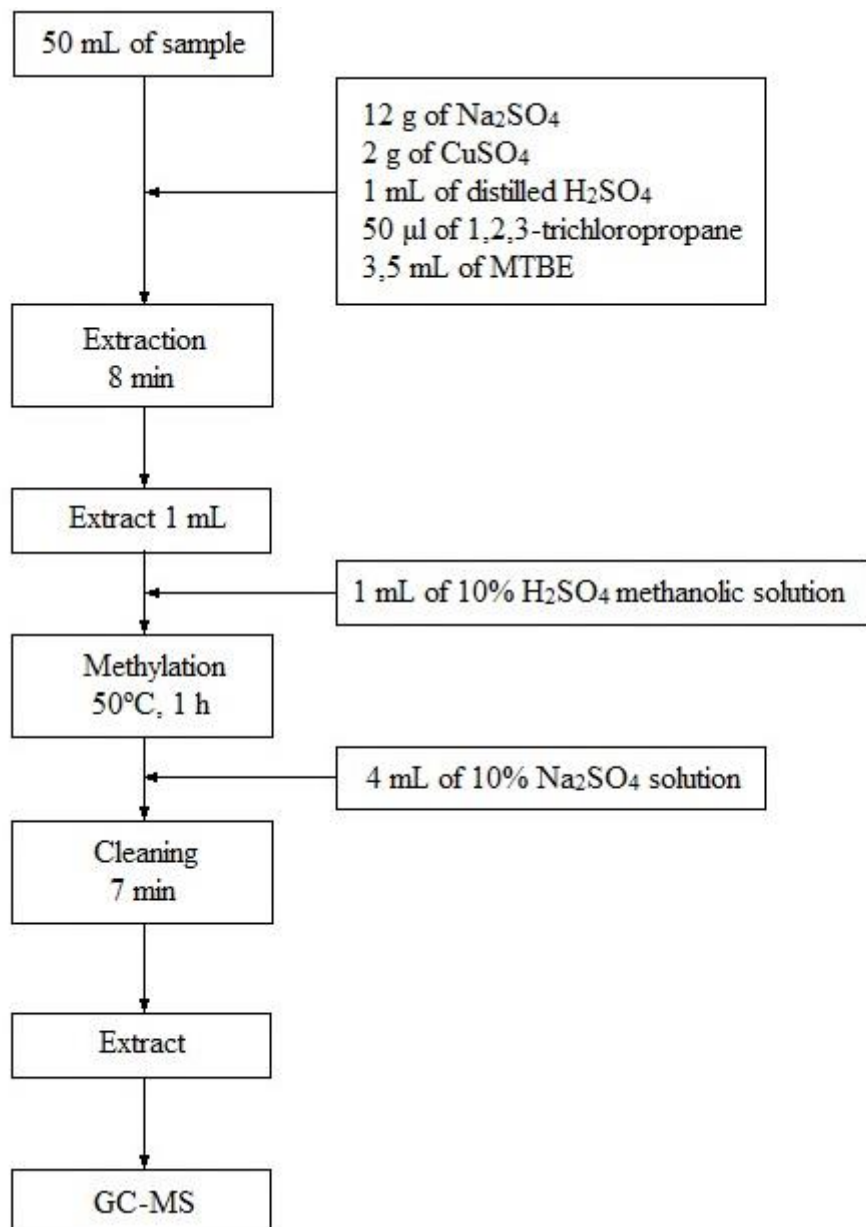


Fig. 1 Flowchart of LLE Analytical Procedure of the HAAs

3. Results and Discussions

3.1 Characterization of Nanoparticles $\text{Fe}_{3-x}\text{Co}_x\text{O}_4$

The nanoparticle synthesis defines its morphology, as well as the type of doping performed. It was verified by chemical analysis that the $\text{Fe}_{3-x}\text{Co}_x\text{O}_4$ nanoparticle consisted of 13% in weight of Co and 58% in weight of Fe. From the TEM image (FIG. 2) it was possible to analyze that the particles catalysts have an average size of 23 nm.

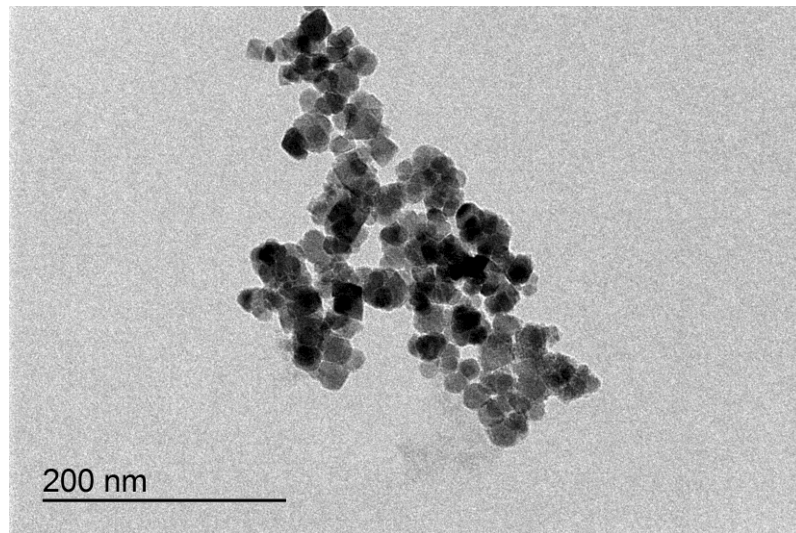


Fig. 2 Photomicrography of the nanoparticle $\text{Fe}_{3-x}\text{Co}_x\text{O}_4$ obtained by TEM

3.2 Degradation of Haloacetic Acids

The effectiveness of the Fenton reaction was evaluated in the HAAs degradation, in which the hydroxyl radicals generated in the decomposition of H_2O_2 in the presence of the $\text{Fe}_{3-x}\text{Co}_x\text{O}_4$ nanoparticle oxidize the organic compounds present in the water (Esteves et al. 2015).

After analysis of the samples by GC-MS was possible calculate the value of the degradation rate (D) of each compound through the Initial Area (A_i) before degradation and the Residual Area (A_r) post-degradation of each peak, as specified in Equation 1.

$$D = \frac{A_i - A_r}{A_i} * 100 \quad (1)$$

Several operational parameters affect the Fenton process, interfering with the degradation of the organic compounds, such as pH, the amount of H_2O_2 and the $\text{Fe}_{3-x}\text{Co}_x\text{O}_4$ nanoparticle, reaction time, temperature and analytes concentration. However, Fenton reagents and pH are the most critical factors (Bello et al. 2018).

Thus, the analysis of a complete factorial planning 2^3 with a central point was carried out, in which the parameters pH, H_2O_2 volume and nanomaterial weight were evaluated in the degradation of each compound, which was of great importance for the optimization of the degradation method. The analyzed parameters and their respective levels, as well as the development of the factorial planning from these, are represented in Table 1 and Table 2 and results of the degradation rates for each of the nine HAAs were exposed in Table 3.

Table 1 Factors and levels determined in complete planning 2^3 with center point

Factors	Levels		
	-1	0	+1
H_2O_2 volume (μL)	200	400	600
pH	3	5	7
Nanomaterial weight (mg)	200	400	600

Table 2 Complete factorial planning 2^3 with center point

Sample	V(X_1)	pH(X_2)	W(X_3)	Volume (H_2O_2)	pH	Weight (magnetite)
1	-1	-1	-1	200	3	200
2	+1	-1	-1	600	3	200
3	-1	+1	-1	200	7	200
4	+1	+1	-1	600	7	200
5	-1	-1	+1	200	3	600
6	+1	-1	+1	600	3	600
7	-1	+1	+1	200	7	600
8	+1	+1	+1	600	7	600
9	0	0	0	400	5	400
10	0	0	0	400	5	400
11	0	0	0	400	5	400

Table 3 Degradation rate for HAAs in percentage (%)

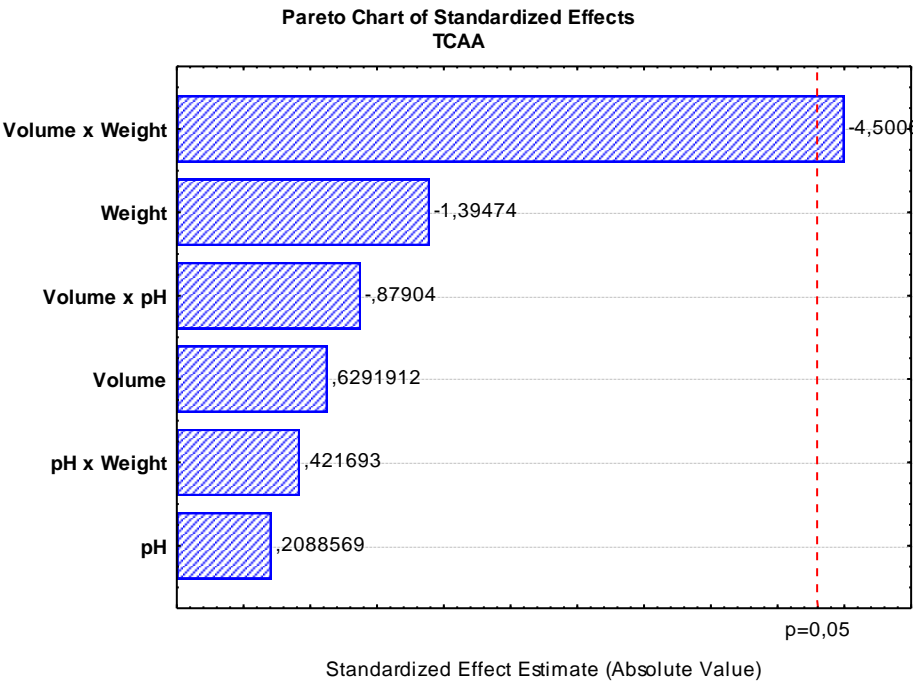
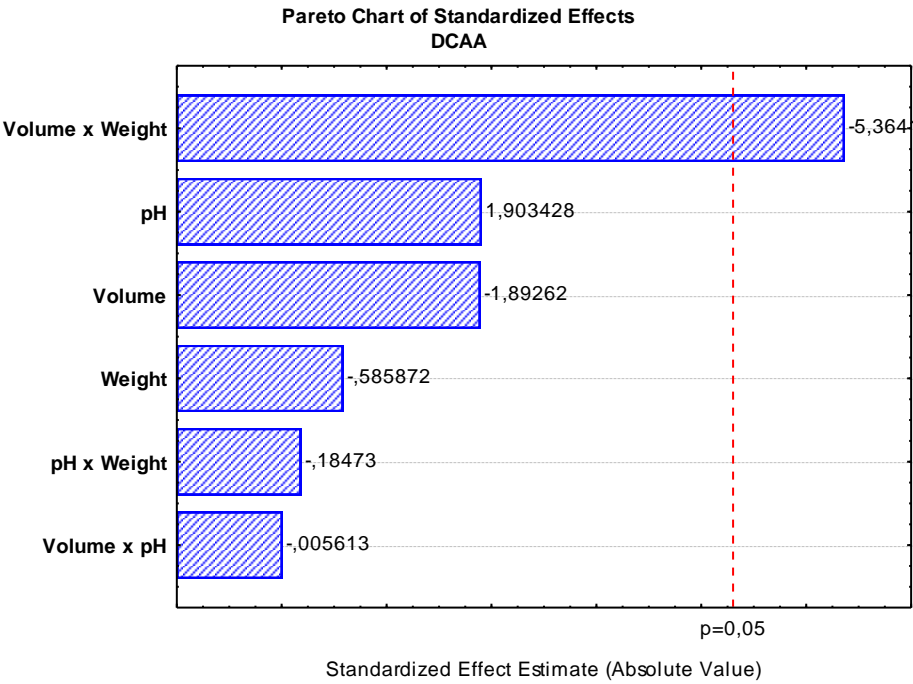
Sample	MCAA	MBAA	DCAA	TCAA	BCAA	DBAA	BDCAA	DBCAA	TBAA
1	26.81	30.38	19.93	23.29	20.71	42.77	77.87	0.49	44.33
2	49.67	32.28	21.59	38.96	36.83	48.75	79.09	40.71	58.17
3	40.41	38.68	19.50	23.17	23.01	46.30	76.29	1.79	54.85
4	40.61	28.93	28.30	37.92	34.12	50.23	80.18	37.96	68.65
5	32.83	33.95	23.82	29.13	25.60	45.17	72.86	7.04	44.80
6	62.50	61.57	16.48	22.48	20.61	43.69	79.02	19.20	69.68
7	38.66	42.41	30.00	35.78	33.80	50.04	77.93	3.89	50.37
8	30.80	26.03	15.48	19.55	16.60	39.02	75.96	15.99	42.00
9	40.17	39.43	27.48	29.94	29.50	48.34	79.07	8.98	49.68
10	32.53	28.18	23.54	38.30	27.36	47.99	83.50	30.33	78.97
11	28.37	27.85	24.10	34.15	26.63	48.17	75.70	14.98	65.08

The Pareto chart of the standardized effects at $p=0.05$ were represented in Figure 3, only for compounds that showed some significant effect ($p<0.05$). To the right of each bar are represented the absolute values of the effects of each variable and interactions. All effects with values greater than 4.3026 ($p=0.05$), which are located to the right of the dashed line, were significant for degradation of HAAs.

3.2.1 Studies of the Effects of Degradation Variables for DCAA, TCAA and BCAA

The results of the effects and errors for the variables analyzed in the planning were obtained for all compounds using Statistica 7.0[®] software and were presented in Table 4 for DCAA, TCAA and BCAA.

The data show that no main effect was significant for the compounds in question. However, by analyzing the second-order effects, it is observed that the interaction of H₂O₂ volume and nanomaterial weight was significant and interferes in the degradation rate.



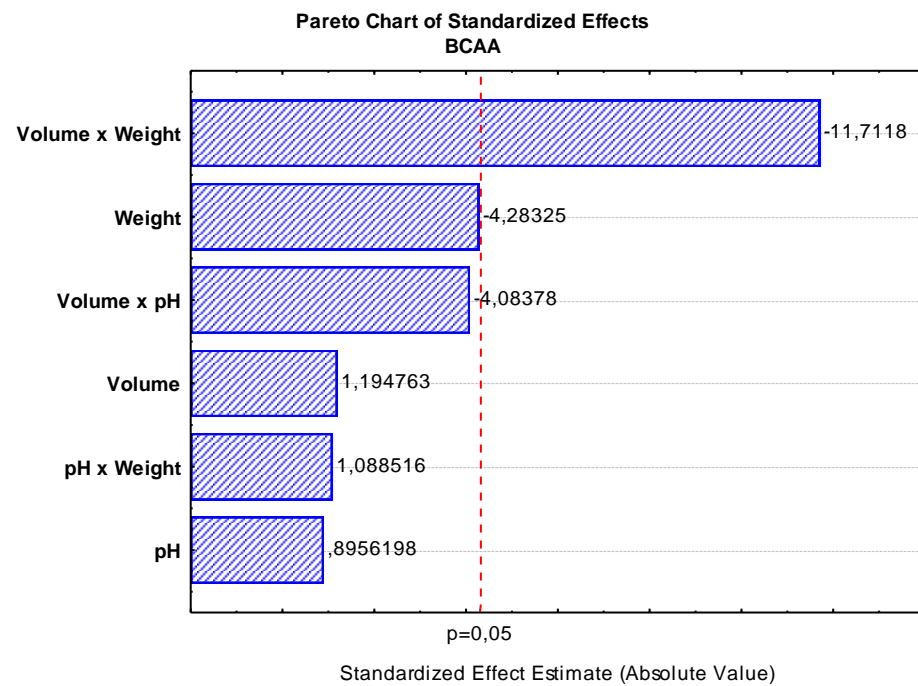
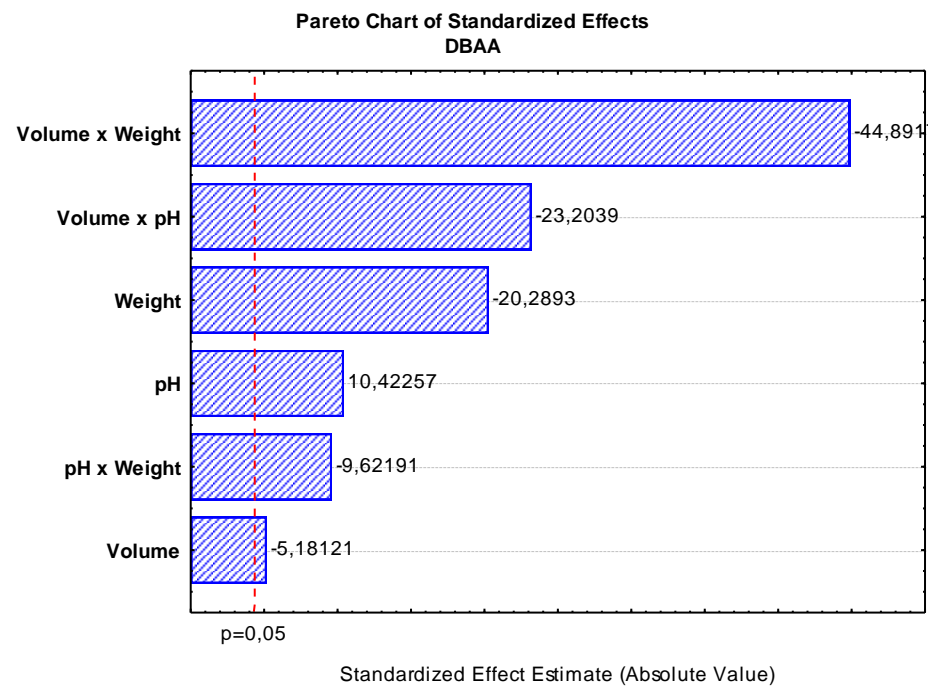
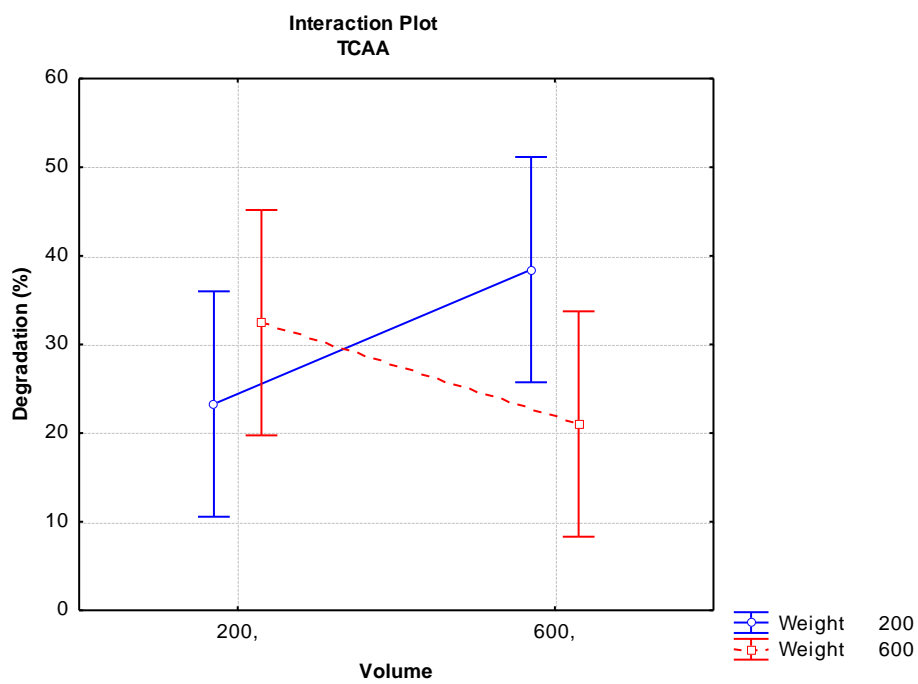
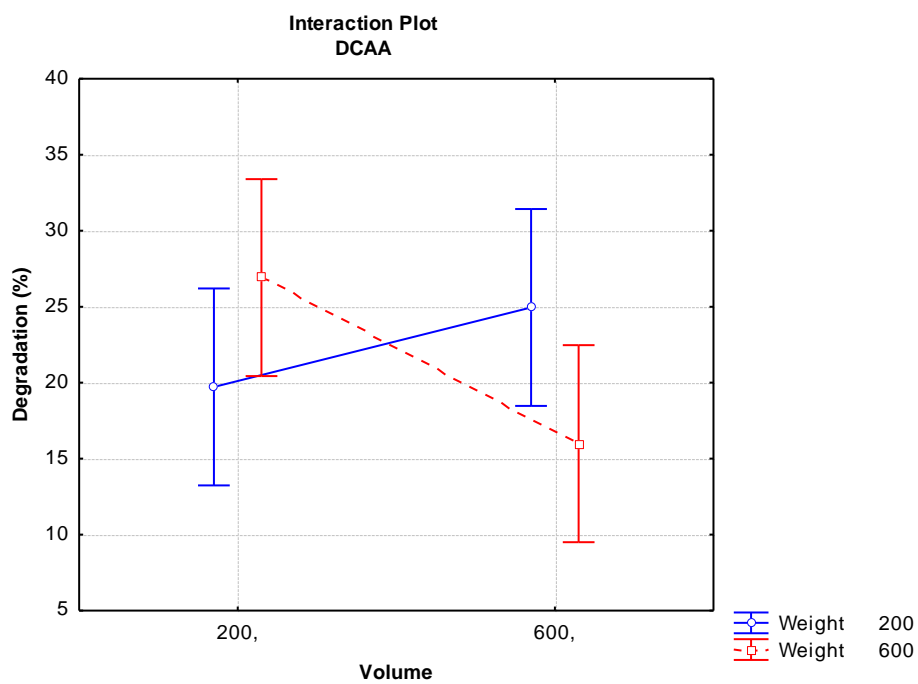


Fig. 3 Pareto charts for the standardized effects for $p=0.05$ of optimization of parameters for degradation of HAAs

Table 4 Effects and errors for the factors studied in complete factorial planning 2³ for degradation of compounds DCAA, TCAA and BCAA

Compound	Factor	Effect Estimates \pm Error			t(2)
DCAA	Mean	22.7539	\pm	0.6423	35.4228
	(1) Volume	-2.8511	\pm	1.5064	-1.8926
	(2) pH	2.8674	\pm	1.5064	1.9034
	(3) Weight	-0.8825	\pm	1.5064	-0.5858
	1 by 2	-0.0084	\pm	1.5064	-0.0056
	1 by 3	-8.0807	\pm	1.5064	-5.3641
	2 by 3	-0.2782	\pm	1.5064	-0.1847
	Mean	30.2549	\pm	1.2600	24.0100
TCAA	(1) Volume	1.8594	\pm	2.9551	0.6291
	(2) pH	0.6172	\pm	2.9551	0.2088
	(3) Weight	-4.1217	\pm	2.9551	-1.3947
	1 by 2	-2.5977	\pm	2.9551	-0.8790
	1 by 3	-13.3002	\pm	2.9551	-4.5006
	2 by 3	1.2462	\pm	2.9551	0.4216
	Mean	26.8016	\pm	0.4496	59.5996
	(1) Volume	1.2600	\pm	1.0546	1.1948
BCAA	(2) pH	0.9445	\pm	1.0546	0.8956
	(3) Weight	-4.5172	\pm	1.0546	-4.2832
	1 by 2	-4.3069	\pm	1.0546	-4.0838
	1 by 3	-12.3516	\pm	1.0546	-11.7118
	2 by 3	1.1480	\pm	1.0546	1.0885

The Figure 4 shows the graphical representation of the significant second order effects that were highlighted in Table 4. The interaction of the H₂O₂ volume and the nanomaterial weight indicates that with the increase in H₂O₂ volume and in the amount of nanoparticles of magnetite, the rate of degradation decreases for DCAA, TCAA and BCAA.



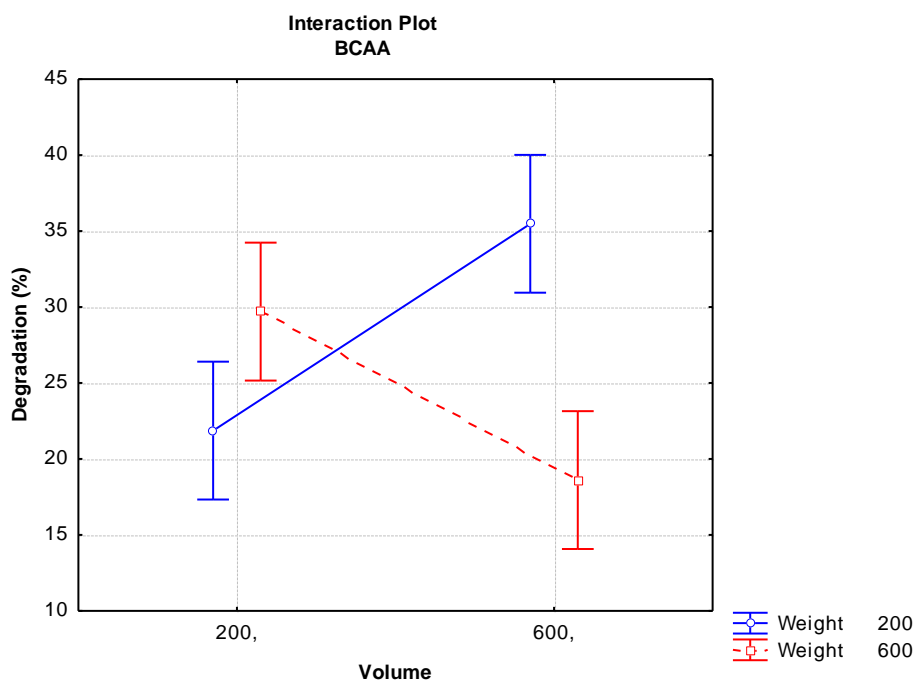


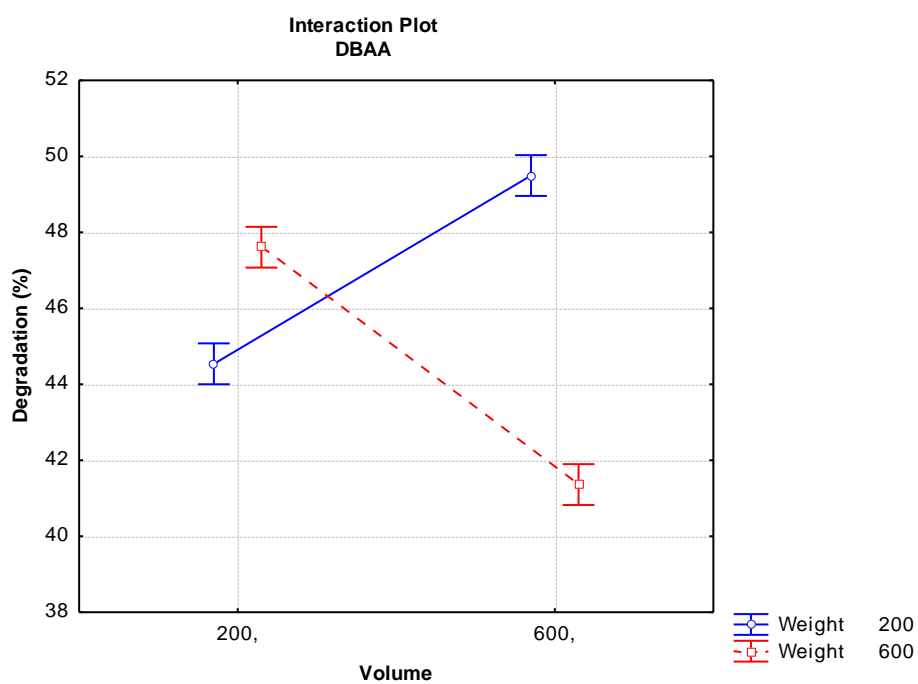
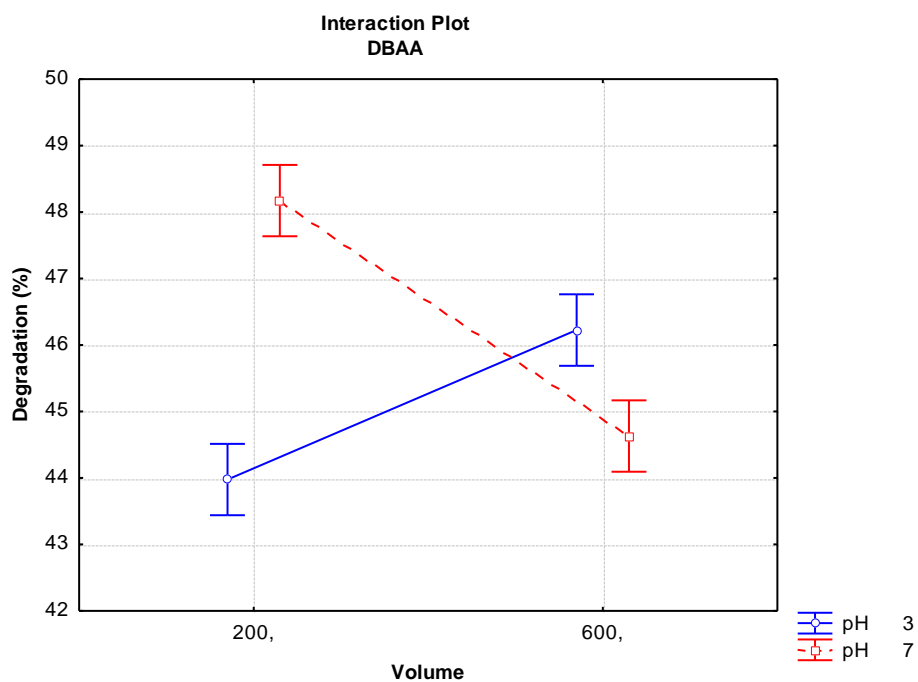
Fig. 4 Interaction effect graphs for optimization of parameters for degradation of DCAA, TCAA and BCAA

3.2.2 Studies of the Effects of Degradation Variables for DBAA

The data of the effects and errors of the variables analyzed for DBAA were exposed in Table 5. Given the results presented, all effects were significant, both the main effects and the second order effects, which indicates their interference in the response of degradation rate.

Table 5 Effects and errors for the factors studied in complete factorial planning 2^3 for degradation of compound DBAA

Factor	Effect Estimates \pm Error			t(2)
Mean	46.4116	\pm	0.0532	872.0786
(1) Volume	-0.6466	\pm	0.1248	-5.1812
(2) pH	1.3008	\pm	0.1248	10.4226
(3) Weight	-2.5323	\pm	0.1248	-20.2893
1 by 2	-2.8961	\pm	0.1248	-23.2039
1 by 3	-5.6029	\pm	0.1248	-44.8917
2 by 3	-1.2009	\pm	0.1248	-9.6219



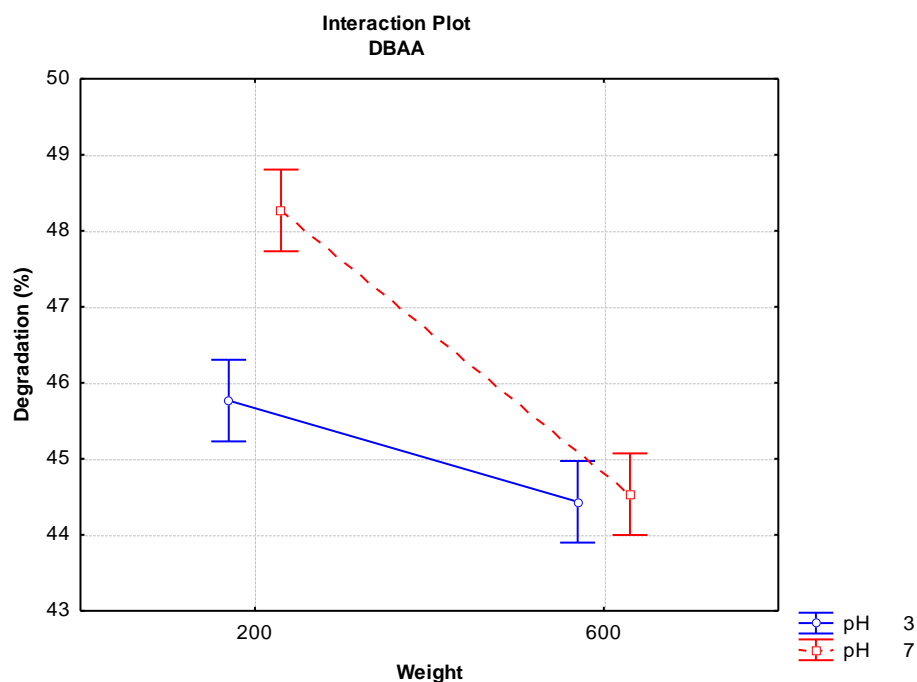


Fig. 5 Interaction effect graphs for optimization of parameters for degradation of DBAA

The significant effects of the variables were exposed in Table 5 and the graphs of the second order interaction effects are plotted in Figure 5. Analyzing the second-order effects, the interaction of H_2O_2 volume and pH shows that with the increase of both variables, the degradation rate decreases for DBAA. The interaction between the H_2O_2 volume and the amount of nanomaterial generates effects similar to the interaction of these factors for DCAA, TCAA and BCAA, in which the increase in the volume of H_2O_2 and of the amount of magnetite nanoparticles causes the decrease in the degradation rate of the DBAA. In the interaction plot of the pH and the weight of the nanoparticles, it is possible to analyze that with the increase of the weight of the magnetite co-doped for both pH values, there is a decrease in the degradation of HAAs.

Through the statistical analysis of the results presented for the factorial planning, it is concluded that the degradation rate of the compounds can be related mainly to the volume of H_2O_2 and the amount of nanomaterial. Therefore, according to the results of the degradation rate and the significant effects analyzed, the best conditions for the degradation of HAAs are: H_2O_2 volume of 600 μL , magnetite doped with cobalt weight of 200 mg and pH 3. Under these conditions, Assay 2 was more favorable in the degradation of HAAs, with degradation rate values of 49.67%, 32.29%, 21.59%, 38.96%, 36.83%, 48.76%, 79.9%,

40.72% and 58.18% for MCAA, MBAA, DCAA, TCAA, BCAA, DBAA, BDCAA, DBCAA, TBAA, respectively.

According to Bello et al. (2018) and Zingaretti et al. (2018), pH is one of the parameters that significantly interferes in the Fenton process. The acid medium benefits the catalytic activity of the nanoparticle and favors the degradation of the organic compounds, because under these conditions there is a greater efficiency in the production of hydroxyl radicals.

The authors Kang and Hwang (2000) and Vilardi et al. (2018), mention that good degradation rates were reached in acidic medium for different organic compounds by the Fenton process, with pH ranging from 2.5 to 4. However, at higher pH, above 4, the efficiency of the reaction decreases, due to the decrease of hydroxyl radicals formation and its degradation capacity.

The ratio of Fenton reagents, H_2O_2 and $\text{Fe}_{3-x}\text{Co}_x\text{O}_4$, also significantly interferes in the degradation of HAAs, because the nanoparticle acts as a catalyst in the decomposition of H_2O_2 for the formation of the hydroxyl radicals and the excess of one of these reagents interferes in its production and consequently in the degradation efficiency (Bello et al. 2018; Chen et al. 2018).

Vilardi, Palma and Verdone (2018) using the Fenton process catalyzed by zero valente iron nanoparticles for the treatment of tannery wastewater, reports an optimal $\text{Fe(II)}/\text{H}_2\text{O}_2$ (w/w) value in the 0.15. According to the authors, excess H_2O_2 can act as a hydroxyl radicals scavenger instead of generating them.

Several studies point to high degradation rates for a wide variety of non-biodegradable organic pollutants through the Fenton reaction using magnetite as the catalyst particle in the process, which had not yet been used for HAAs degradation. Among these studies 85% for 2,4,6-trinitrotoluene (Matta, Hanna, Chiron and 2007), 90% for pentachlorophenol (Xue et al. 2009), 98% for orange acid II (Liang et al. 2010) and above 80% for petroleum hydrocarbon (Usman et al. 2012).

By comparing the results of degradation of HAAs with that of other contaminants by the Fenton process in the literature, the efficiency of the method is concluded by the good degradation rates and it is perceived its importance due to the lack of methods that promote the degradation of these contaminants.

3.3 Evaluation of Cytotoxicity, Genotoxicity and Mutagenicity by *Allium cepa* bioassay

3.3.1 Cytotoxicity Analysis

The analyzes referring to the cytotoxic potential were based on the microscopic parameter, which is based on the mitotic index (MI). The MI is characterized by the total number of cells in division in the cell cycle, which is related to root growth. The results were obtained based on the evaluation of approximately 5000 cells in the total of the slides analyzed for each sample.

Thus, for the analysis of microscopic cytotoxicity, mitotic cell divisions were observed for each sample, according to Figure 6. The mitotic index (MI) was calculated through Equation 2. The concentration of HAAs for the samples used in this test was defined using as reference the maximum value allowed for these compounds in water determined by Brazilian standards of potability at $80 \mu\text{g L}^{-1}$, determining a value below and above this for the sum of the nine HAAs.

$$\text{MI} = \frac{\text{number of cells in division}}{\text{total number of cells observed}} * 100 \quad (2)$$

The mitotic index data for each of the samples, by the counts performed by optical microscopy, were analyzed by the software GraphPad Prism 7 and the results were presented in Table 6. The quantities of divisions found in the ten slides analyzed for each samples are shown in Figure 7, for 24 hours of exposure.

The results obtained for the mitotic indices show that there were statistically significant differences ($p < 0.05$) between the negative control and the Magnetite and HAA_{5ppb} PD samples according to the Mann Whitney test, for $p = 0.0041$ and $p = 0.0001$, respectively. Thus, with increased exposure time to magnetite and HAAs, there is a reduction in MI, and by statistical tests, it is concluded that both have a cytotoxic potential at the microscopic level.



Fig. 6 Photomicrography of optical microscope of the phases of cell division. A. prophase; B. metaphase; C. anaphase and D. telophase, final magnification of 1000x

Table 6 Number of cells in cell division and MI

Samples	Total number of cells analyzed	Number of cells in Interphase	Number of cells in Mitosis	Mitotic Index (MI)
C ⁻ *	5000	4855	145	2.90
Magnetite	5000	4961	39	0.78
HAA _{5ppb}	5000	4806	194	3.88
HAA _{5ppb} PD	5000	4994	6	0.12
HAA _{150ppb}	5000	4757	243	4.86
HAA _{150ppb} PD	5000	4845	155	3.1

* Ultrapure water

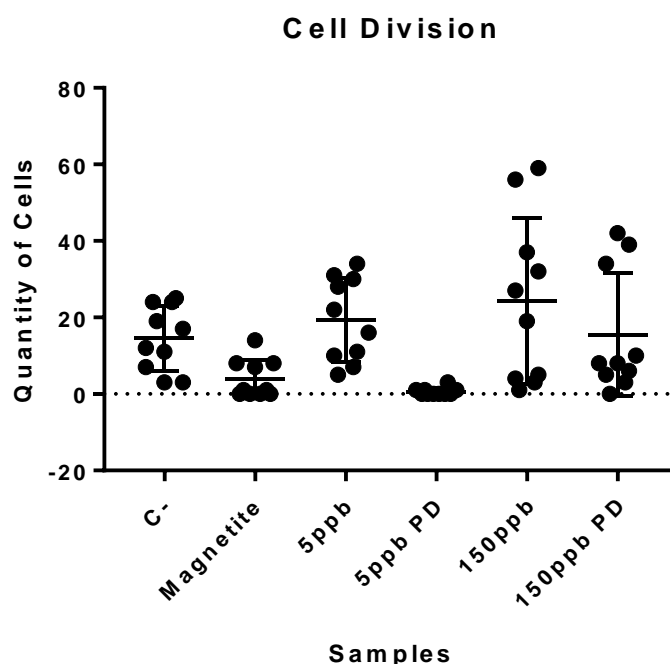


Fig. 7 Cell division of the analyzed samples and standard deviation around the mean for 24 hours of exposure

3.3.2 Genotoxicity Analysis

The chromosomal aberrations, evaluated for genotoxicity analysis, are characterized by changes in chromosomal structures or in the total number of chromosomes, considered at different stages of cell division, which may occur spontaneously or as a result of exposure of contaminants.

The study of genotoxicity was performed through analyzes of the chromosome aberrations (CA) present in the slides prepared for this study. The alterations considered for this study were C-metaphase, metaphase with chromosome loss, metaphase with chromosome break, anaphase bridge, anaphase with chromosome break, anaphase with chromosome loss, telophase bridge and telophase with chromosome loss, some represented in Figure 8. Approximately 5000 cells were evaluated for each sample for obtaining genotoxic results.



Fig. 8 Photomicrography of optical microscope of the chromosomal aberrations. A₁. anaphase bridge; B₁. anaphase with chromosome break; C₁. telophase bridge and micronucleus, final magnification of 1000x

The results concerning chromosomal aberrations were presented in Table 7 and in Figure 9.

Table 7 Result of the chromosomal aberrations found in the analyzes

Samples	Bridge	Loss	Break	Bridge and Loss	Bridge and Break	Loss and Break	C-metaphase	Total CA
C ⁻ *	7	1	3	0	0	1	3	15
Magnetite	8	1	0	0	0	0	3	12
HAA _{5ppb}	14	1	1	0	0	0	5	21
HAA _{5ppb} PD	0	1	0	0	0	0	0	1
HAA _{150ppb}	9	7	4	0	0	0	8	28
HAA _{150ppb} PD	10	1	0	0	0	0	5	16

* Ultrapure water

The results obtained of the analysis of the root meristems, submitted to the magnetite samples and the different concentrations of the HAAs, were evaluated by the Mann Whitney statistical test, with the statistical comparison of the frequency of the chromosomal aberrations between the HAAs and magnetite samples and the negative control. The statistical test indicated that there were statistically significant differences ($p < 0.05$) between the HAA_{5ppb} PD samples and negative control ($p = 0.0263$).

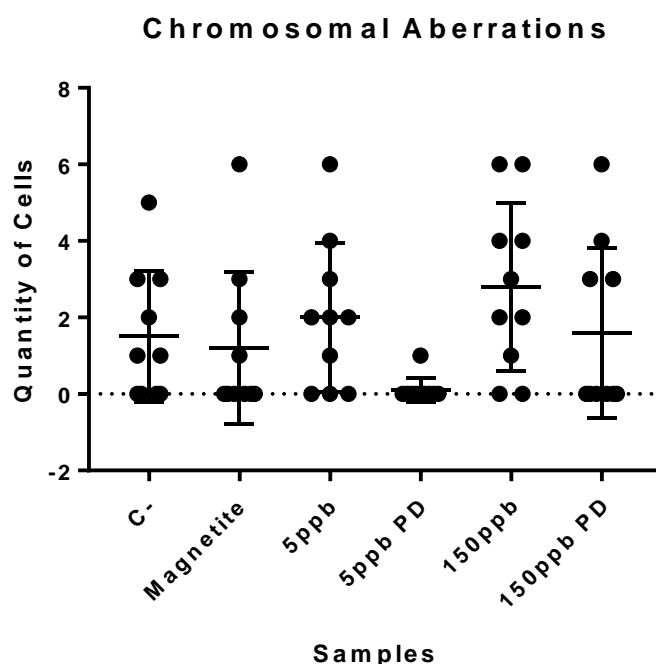


Fig. 9 Chromosomal aberrations analyzed and standard deviation around the mean for 24 hours of exposure

The statistical difference found between the negative control and the sample presented for genotoxicity evaluation was due to the low amount of chromosome aberrations in the sample of HAA_{5ppb} PD compared to the negative control. However, the samples of HAA_{5ppb} and HAA_{150ppb}, presented higher number of CA than the other samples, but there were no statistically significant differences in comparison to the negative control.

In conclusion, according to the statistical tests, HAAs and magnetite do not have genotoxic potential.

3.3.3 Mutagenicity Analysis

The analysis of the mutagenic potential was carried out based on the frequencies of meristematic cells carrying micronuclei. The micronucleo rise of the development of some chromosomal aberrations, such as chromosomal breaks and losses, by the development of a new membrane that involves a piece of chromatin that failed to pass to the poles during the anaphase of cell division.

The analysis was performed for all phases of the cell cycle (interphase, prophase, metaphase, anaphase and telophase), of a total of 5000 cells counted for each sample. The Figure 10 shows the mutagenicity anomalies in contaminated cells.

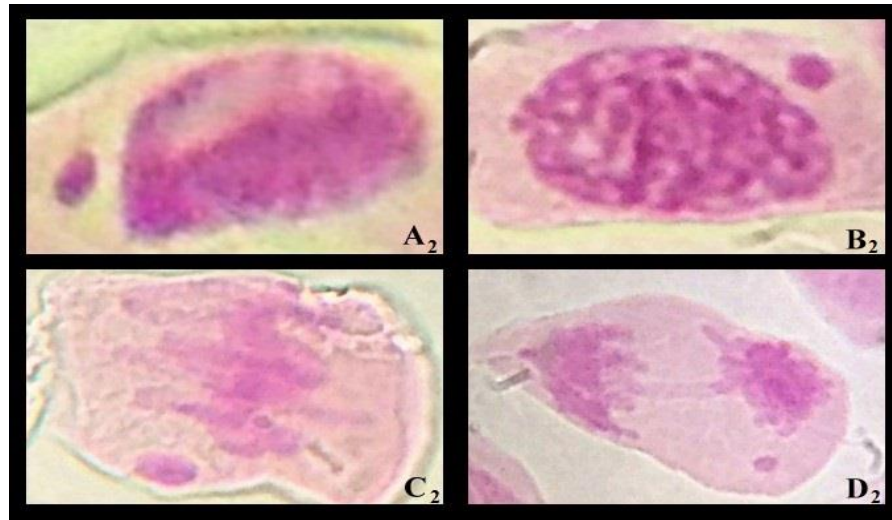


Fig. 10 Photomicrography of optical microscope of the micronuclei present in the mitotic phases. A₂ interphase with micronucleus; B₂ prophase with micronucleus; C₂ metaphase with micronucleus; D₂ telophase with bridge and micronucleus, final magnification of 1000x

The results obtained from the occurrence of micronuclei in the analyzed samples were presented in Table 8 and Figure 11.

Table 8 Data of the micronuclei found in the analyzed samples

Samples	Total number of cells analyzed	Occurrence of Micronuclei
C ⁻ *	5000	11
Magnetite	5000	38
HAA _{5ppb}	5000	67
HAA _{5ppb} PD	5000	104
HAA _{150ppb}	5000	99
HAA _{150ppb} PD	5000	101

* Ultrapure water

According to the results, the samples with the highest concentration of HAAs had a higher number of cells with micronuclei. In addition, differences between the samples before and after degradation were identified, in which samples after degradation represented more cells with micronucleus due to the mutagenicity of the magnetite, which possibly was not completely removed with the aid of the magnet, together with the mutagenicity of the HAAs which are not totally degraded by the Fenton method. An alternative to decrease the mutagenicity caused by these compounds will be the effective removal of the magnetite by centrifugation of the sample.

Data from analyzes of the presence of micronucleus in the cells were submitted to the Mann-Whitney statistical test, indicating that there was a statistically significant difference ($p < 0.05$) between all the samples and negative control after 24 h of exposure, as represented in Table 9. Thus, it is concluded that magnetite and HAAs, even in concentrations below those regulated by legislation on drinking water, have a mutagenic potential.

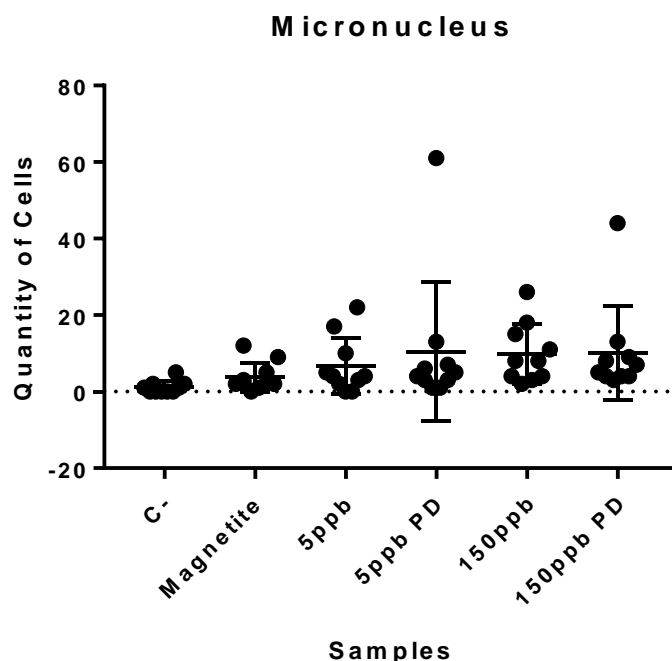


Fig. 11 Occurrence of micronuclei in the analyzed samples and standard deviation around the mean for 24 hours of exposure

Table 9 Statistical comparison between samples with C⁻ for analysis of mutagenicity

Comparison	p value (p<0.05)	Situation
Magnetite	0.0281	Significant
HAA _{5ppb}	0.0222	Significant
HAA _{5ppb}	0.0019	Significant
HAA _{150ppb}	0.0002	Significant
HAA _{150ppb}	0.0001	Significant

* Ultrapure water

Studies show the toxicity of different nanomaterials and disinfection by-products through different applications. The author Chen et al. (2017), after presenting several studies, states that the use of nanomaterials causes adverse effects on human cells. Rahman et al. (2002) verified the formation of micronuclei in hamster embryo cells due to exposure to titanium dioxide nanoparticles, indicating their mutagenic potential. The cytotoxic effect of iron oxide nanoparticles on human pulmonary alveolar epithelial cells was verified by Dwivedi et al. (2014) through the application of the cell viability MTT assay and the in vitro phototoxicity 3t3 NRU assay. According to Debnath et al. (2018), silver and gold nanoparticles cause chromosomal aberrations and decrease of the mitotic index in the cells of the root of *Allium cepa*, evidencing its cytotoxic and genotoxic effects. The same effects were verified by the authors Kumari et al. (2009) and Mangalampalli, Dumala and Grover (2018) in the use of the *Allium cepa* bioassay to evaluate the zinc oxide and magnesium oxide nanoparticles, respectively.

According to Cortés and Marcos (2018), the disinfection by-products of drinking water have mutagenic effects and may cause adverse health effects. Zhang et al. (2016) tested the toxicity of the main disinfection byproducts, including HAAs (MCAA, DCAA, TCAA, MBAA and DBAA) by SOS/umu assay and observed that they present cytotoxic and mutagenic potential. The author Zhang et al. (2012), used the same compounds for analysis of DNA damage in human-derived line (HepG2), confirming its genotoxicity, except for MCAA. Cytotoxicity and genotoxicity assays were performed by Plewa et al. (2002) in hamster ovary cells AS52 for HAAs, concluding that brominated HAAs showed higher cytotoxicity and genotoxicity than chlorates. Richardson et al. (2007), through the review of

studies related to disinfection by-products, attests that HAAs (MCAA, MBAA, DBAA, TBAA) were mutagenic in bacteria and induced DNA damage in vitro in mammalian cells.

4. Conclusions

The presence of HAAs in drinking water, formed in the process of chlorination in Water Treatment Plants, is detrimental to human health, therefore, the development and use of an effective and low cost method capable of degrading these compounds is of great importance, also considering the need to follow the drinking water regulations for human consumption.

Therefore, the Fenton-like reaction with the use of nanoparticle magnetite doped with cobalt was evaluated for the degradation of HAAs dispersed in water samples, as a form of environmental remediation. Cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity tests were performed for the identification of these organic compounds.

The Fenton method presented good results, with a higher degradation rate of 62.5%, 61.57%, 30.01%, 38.96%, 36.83%, 50.23%, 83.5%, 40.72% and 78.97% for MCAA, MBAA, DCAA, TCAA, BCAA, DBAA, BDCAA, DBCAA and TBAA, respectively, being considered efficient for the degradation of HAAs.

The *Allium cepa* test presented positive results of cytotoxicity and mutagenicity for magnetite and HAAs, at a concentration of 45 $\mu\text{g L}^{-1}$ for the sum of the analyzed compounds, below that established by the *Ministério da Saúde* in Brazil, which defined the maximum allowed value of the sum of seven HAAs plus DALAPON in treated water of 80 $\mu\text{g L}^{-1}$, indicating the great health risks generated by potable water.

Acknowledgments

The authors are grateful to CAPES, FAPEMIG, CNPq, FUNASA and UFVJM for financial supports and fellowships.

References

- Bello MM, Raman AAA, Asghar A (2018) A review on approaches for addressing the limitations of Fenton oxidation for recalcitrant wastewater treatment. *Process Safety and Environmental Protection*. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.03.034>
- Bianchi J, Mantovani MS and Marin-Morales MA (2015) Analysis of the ‘ genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. *Journal of Environmental Sciences* 36:102-111. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2015.03.034>
- BRASIL. Portaria Ministério da Saúde nº 05, de 28 de setembro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União
- Chen L, Chen C, Wang P and Song T (2017) Mechanisms of Cellular Effects Directly Induced by Magnetic Nanoparticles under Magnetic Fields: Review Article. *Journal Of Nanomaterials: Hindawi* 1-13. <https://doi.org/10.1155/2017/1564634>
- Chen Y, Chen Y, Li Y, Wu Y, Zhu F, Zeng G, Zhang J and Li H (2018) Application of Fenton pretreatment on the degradation of rice straw by mixed culture of *Phanerochaete chrysosporium* and *Aspergillus niger*. *Industrial Crops and Products* 112:290-295. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.005>
- Chiavelli LUR (2014) Ácidos Haloacéticos em água potável: a formação de subprodutos da desinfecção durante o tratamento da água. Novas Edições Acadêmicas, Maringá
- Cortés C and Marcos R (2018) Genotoxicity of disinfection byproducts and disinfected waters: A review of recent literature. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 831:1-12. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.04.005>
- Debnath P, Mondal A, Hajra A, Das C and Mondal NK (2018) Cytogenetic effects of silver and gold nanoparticles on *Allium cepa* roots. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.07.007>
- Dwivedi S, Siddiqui MA, Farshori NN, Ahamed M, Musarrat J and Al-Khedhairi AA (2014) Synthesis, characterization and toxicological evaluation of iron oxide nanoparticles in

human lung alveolar epithelial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 122:209-215. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.06.064>

Esteves LCR, Oliveira TRO, Junior ECS, Bomfeti CA, Gonçalves AM, Oliveira LCA, Junior FB, Pereira MC and Rodrigues JL (2015) A fast and environment-friendly method for determination of chemical oxygen demand by using the heterogeneous Fenton-like process ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}_3\text{-xCoxO}_4$ nanoparticles) as an oxidant. *Talanta* 135:75-80. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.11.055>

Geissen V, Mol H, Klumpp E, Umlauf G, Nadal M, Ploeg M, Zee SEATM and Ritsema CJ (2015) Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. *International Soil and Water Conservation Research* 3(1):57-65. <https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.03.002>

Grant WF (1982) Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research* 99(80):273-91. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(82\)90046-X](https://doi.org/10.1016/0165-1110(82)90046-X)

Hong Y, Song H and Karanfil T (2013) Formation of haloacetic acids from dissolved organic matter fractions during chloramination. *Water Research* 47(3):1147-1155. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.025>

Kang YW and Hwang KY (2000) Effects of reaction conditions on the oxidation efficiency in the Fenton process. *Water Research* 34(10):2786-2790. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00388-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00388-7)

Kumari M, Mukherjee A and Chandrasekaran N (2009) Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of The Total Environment* 407:5243-5246. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.06.024>

Leme DM and Marin-Morales MA (2008) Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water-A case study. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 650(1):80-86. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.10.006>

Leme DM and Marin-Morales MA (2009) *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 682(1):71-81. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>

- Liang X, Zhong Y, Zhu S, Zhu J, Yuan P, He H and Zhang J (2010) The decolorization of Acid Orange II in non-homogeneous Fenton reaction catalyzed by natural vanadium-titanium magnetite. *Journal of Hazardous Materials* 181(1–3):112-120. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.04.101>
- Lima GM (2014) Desenvolvimento de correlação de formação de ácidos haloacéticos em água contendo substância húmica oxidada com cloro. Dissertação de mestrado, Universidade de Ribeirão Preto
- Liu Y and Mou S (2004) Determination of bromate and chlorinated haloacetic acids in bottled drinking water with chromatographic methods. *Chemosphere* 55(9):1253-1258. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.12.023>
- Mangalampalli B, Dumala N and Grover P (2018) *Allium cepa* root tip assay in assessment of toxicity of magnesium oxide nanoparticles and microparticles. *Journal Environmental Science* 66:125-137. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.05.012>
- Matta R, Hanna K and Chiron S (2007) Fenton-like oxidation of 2,4,6-trinitrotoluene using different iron minerals. *Science of the Total Environment*, 385(1–3):242-251. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.06.030>
- Petrie B, Barden R and Kasprzyk-Hordern B (2014) A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Research* 72:3-27. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053>
- Plewa MJ, Kargalioglu Y, Vankerk D, Minear RA and Wagner ED (2002) Mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity analysis of drinking water disinfection by-products. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 40(2):134-142. <https://doi.org/10.1002/em.10092>
- Rahman Q, Lohani M, Doop E, Pemsel H, Jonas L, Weiss DG and Schiffmann D (2002) Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Environ. Health Perspect* 110(8):797-800. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110797>
- Richardson SD, Plewa MJ, Wagner ED, Schoeny R and Demarini DM (2007) Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in

- drinking water: a review and roadmap for research. *Mutation Research* 636(1–3):178-242. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.09.00>
- Schulte P, Bayer A, Kuhn F, Luy T and Volkmer M (1995) H_2O_2 / O_3 , H_2O_2 / UV And H_2O_2 / Fe^{2+} Processes For The Oxidation Of Hazardous Wastes. *Ozone: Science & Engineering* 17(2):119-134. <https://doi.org/10.1080/01919519508547541>
- Usman M, Faure P, Hanna K, Abdelmoula M and Ruby C (2012) Application of magnetite catalyzed chemical oxidation (Fenton-like and persulfate) for the remediation of oil hydrocarbon contamination. *Fuel* 96:270-276. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2012.01.017>
- Vilardi G, Palma LD and Verdone N (2018) On the critical use of zero valent iron nanoparticles and Fenton processes for the treatment of tannery wastewater. *Journal of Water Process Engineering* 22:109-122. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2018.01.011>
- Vilardi G, Sebastiani D, Miliziano S, Verdone N and Palma LD (2018) Heterogeneous nZVI-induced Fenton oxidation process to enhance biodegradability of excavation by-products. *Chemical Engineering Journal* 335:309-320. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.10.152>
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION (2011) *Guidelines for Drinking-water Quality*, v.1. 4th ed. Geneva
- Xie Y (2001) Analyzing Haloacetic Acids Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Water Research* 35(6):1599-1602. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00397-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00397-3)
- Xue X, Hanna K, Despas C, Wu F and Deng N (2009) Effect of chelating agent on the oxidation rate of PCP in the magnetite/ H_2O_2 system at neutral pH. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 311(1–2):29-35. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2009.06.016>
- Zhang L, Xu L, Zeng Q, Zhang S, Xie H, Liu A and Lu W (2012) Comparison of DNA damage in human-derived hepatoma line (HepG2) exposed to the fifteen drinking water disinfection byproducts using the single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 741(1-2):89-94. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.11.004>
- Zhang SH, Mion D, Tan L and Liu A (2016) Comparative cytotoxic and genotoxic potential of 13 drinking water disinfection by-products using a microplate-based cytotoxicity

assay and a developed SOS/umu assay. *Mutagenesis* 31(1):35-41. <https://doi.org/10.1093/mutage/gev053>

Zingaretti D, Lombardi F and Baciocchi R (2018) Soluble organic substances extracted from compost as amendments for Fenton-like oxidation of contaminated sites. *Science of the Total Environment* 619–620:1366-1374. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.178>

Considerações finais

A presença dos AHAs em água de abastecimento, formados no processo de cloração nas Estações de Tratamento de Água, é prejudicial à saúde humana, portanto, o desenvolvimento e a utilização de um método eficaz e de baixo custo capaz de degradar esses compostos são de grande importância, visto também a necessidade de se atender às portarias de potabilidade da água para consumo humano.

Diante disso, foi avaliada a reação de Fenton-like com o uso da nanopartícula magnetita dopada com cobalto para a degradação dos AHAs dispersos em amostras de água, como forma de remediação ambiental. Testes de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade foram realizados para a identificação desses compostos orgânicos.

O método de Fenton apresentou bons resultados, com maior taxa de degradação de 83%, 62%, 60%, 77%, 77%, 80%, 77%, 81% e 78% para MCAA, MBAA, DCAA, TCAA, BCAA, DBAA, BCDA, DBCA e TBAA, respectivamente, sendo considerado eficiente para a degradação parcial dos AHAs.

O Teste *Allium cepa* apresentou resultados positivos de citotoxicidade e mutagenicidade para a magnetita e os AHAs, a uma concentração de $45 \mu\text{g L}^{-1}$ para a soma dos compostos analisados, abaixo da estabelecida pela portaria de potabilidade brasileira, que defini o valor máximo permitido dos AHAs totais em água tratada de $80 \mu\text{g L}^{-1}$, indicando os grandes riscos a saúde gerados pela água de abastecimento.